

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE EMPAQUE Y TEMPERATURA DE
ALMACENAMIENTO EN LA SUPERVIVENCIA DE *Listeria monocytogenes*
EN SALCHICHAS ARTESANALES**

Presentado por:

Licda. Ana Delmy Hércules de Melara

**PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRA EN MICROBIOLOGÍA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS**

NOVIEMBRE DE 2014

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

RECTOR

Ing. Mario Roberto Nieto Lovo

SECRETARIA GENERAL

Dra. Ana Leticia Zavaleta de Amaya

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

Licda. Anabel de Lourdes Ayala de Soriano

SECRETARIO

Lic. Remberto Mixco López

COMITÉ DE TESIS

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

Miembro Docente Director

MSc. Amy Elieth Morán

Miembro Docente

MSc. Andrés Wilfredo Rivas

Miembro Comité de Tesis

MSc. Ligia Elizabeth Salazar Banegas

Miembro Comité de Tesis

COORDINACIÓN DEL PROGRAMA DE POSGRADO

MSc. Edith Alicia de Torres

Jefe de Postgrado de la Facultad de
Química y Farmacia.

MSc. Coralía de los Ángeles González de Díaz

Coordinadora de Maestría

Licda. Ana Delmy Hércules de Melara

Estudiante

Agradecimiento

A Dios todopoderoso y nuestra madre Maria por darme la vida y la oportunidad de concluir con esta nueva etapa.

A mi Madre por su incansable apoyo y estar siempre a mi lado.

A mi familia por estar presentes en todos los momentos de mi vida.

A mis maestras Evelyn Sánchez de Ramos y Amy Flieth Morán por su valiosa ayuda en la conducción de este trabajo de investigación.

A mis maestros por todos los conocimientos transmitidos

A los miembros del comité de tesis MSc Ligia Elizabeth Salazar, MSc Andrés Wilfredo Rivas. Por su valiosa colaboración para la finalización de esta investigación.

En especial a mi maestro Ing Francisco Merino por su valiosa asesoría.

A mis amigos Marina Luz, esposos Amaya, Nilson y Nuria de Vargas por su apoyo.

A mis amigos y compañeros de trabajo por su ayuda y palabras de aliento que siempre me brindaron.

A Don Rafael Jovel por su valiosa cooperación

Licda. Ana Delmy Hércules de Melara

INDICE GENERAL

	Pág.
Abreviaturas	
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción.....	xix
Capítulo II	
2.0 Objetivos.....	23
Capítulo III	
3.0 Marco teórico	
3.1 Antecedentes de La Industria Cárnica de El Salvador.....	25
3.2 Propiedades de la carne y productos cárnicos.....	26
3.3 Clasificación de embutidos.....	27
3.4 Alteraciones de los Productos Cárnicos	31
3.5 Factores que afectan la vida de anaquel de salchichas.....	33
3.6 Preservación de productos cárnicos.....	34
3.7 El riesgo de los productos cárnicos Listos para Consumir (LPC)	35
3.8 Generalidades sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	38
3.9 Etiología	43
3.10 Ciclo Patogénico	43

3.11	Virulencia	45
3.12	Importancia de <i>Listeria monocytogenes</i> en la industria	46
3.13	Resistencia de <i>Listeria monocytogenes</i> a los antibióticos y sanitizantes	48
3.14	Brotos asociados a <i>Listeria monocytogenes</i>	50
3.15	Programas de control.....	52
3.16	Legislación.....	55
Capítulo IV		
4.0	Metodología de Investigación.....	60
4.1	Metodología de Campo.....	60
4.2	Recolección de muestras.....	60
4.3	Metodología de Laboratorio.....	61
4.4	Metodología de Analítica.....	61
Capítulo V		
5.0	Resultados y Discusión de resultados.....	64
5.1	Resultados de Buenas Prácticas de Manufactura.....	65
5.2	Efecto de la Temperatura sobre el crecimiento de <i>Listeria</i> <i>Monocytogenes</i> en empaque vacío y granel.....	69
5.3	Evaluación del efecto del empaque sobre el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> a temperatura de 5°C y 25° C.....	71

5.4	Relación del crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> y el tiempo de almacenamiento	73
5.5	Verificación de los cambios de humedad en los diferentes tiempos y condiciones de almacenamiento.....	77
5.6	Resultados de Humedad Salchicha a vacío.....	78
5.7	Verificación de los de pH en los diferentes tiempos y condiciones de almacenamiento.....	79
5.8	Resultados de valores de pH Salchichas a granel.....	80
5.9	Metodología Estadística.....	81
Capítulo VI		
6.0	Conclusiones.....	83
Capítulo VII		
7.0	Recomendaciones.....	87
	Referencia Bibliográfica.....	90
	Anexos.....	104

INDICE DE CUADROS

CUADRO No.	Pág. N°
1. Bacterias Patógenas aisladas de Cárnicos	32
2. Factores que impactan en el crecimiento y supervivencia de la Bacteria	40
3. Serovariedades de especies de <i>Listerias</i>	41
4. Lista de Verificación de Buenas Prácticas de Manufactura	123
5. Diferenciación y características de las Especies del género <i>Listeria</i>	129
6. Reacciones Hemolíticas de especies de <i>Listeria</i>	130
7. Reacciones diferenciales de especies de <i>Listeria</i>	131
8. Norma Salvadoreña 67.02.13:98 Carnes y Productos Cárnicos Embutidos.....	132
9. Certificados de Análisis de las Cepas patrones	137

INDICE TABLAS

TABLA No.		Pág. N°
1.	Casos de brotes en España y Unión Europea	51
2.	Lista de verificación de los Aspectos Sanitarios Generales de los Establecimientos Alimentarios.....	65
3.	Crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> evaluando efecto de temperatura empaque vacío.....	69
4.	Crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> evaluando efecto de temperatura empaque granel.....	70
5.	Crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> evaluando efecto de empaque a temperatura 5°C.....	71
6.	Crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> evaluando efecto de empaque a temperatura 25°C.....	72
7.	Resultado de humedad en empaque a granel.....	77
8.	Resultado de humedad en empaque a vacío	78
9.	Resultado de pH en empaque a vacío	79
10.	Resultado de pH en empaque a granel	80

11. Análisis Estadístico T0	105
12. Media y desviación estándar en T0	105
13. Análisis de varianza T0	106
14. Prueba de comparaciones múltiples Tukey T0.....	107
15. Análisis Estadístico T1	108
16. Media y desviación estándar en T1	108
17. Análisis de varianza T1	109
18. Prueba de comparaciones múltiples Tukey T1	110
19. Análisis Estadístico T2	111
20. Media y desviación estándar enT2	111
21. Análisis de varianzaT2	112
22. Prueba de comparaciones múltiples TukeyT2	113
23. Análisis Estadístico T4	114
24. Media y desviación estándar enT4	114
25. Análisis de varianzaT4	115
26. Prueba de comparaciones múltiples TukeyT4	116
27. Crecimiento obtenido en salchicha empacada a vacío y almacenada a 5°C	117

28. Crecimiento obtenido en salchicha empacada a vacío y almacenada en 25°C	117
29. Crecimiento obtenido en salchicha empacada a granel y almacenada a 5°C	118
30. Crecimiento obtenido en salchicha empacada a vacío y almacenada a 25°C	118
31. Resultados de Humedad y pH	119

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	Pág. N°
1. <i>Listeria monocytogenes</i>	39
2. Ciclo patogénico de <i>Listeria monocytogenes</i>	44
3. Formación de Biofilm de <i>Listeria monocytogenes</i>	47
4. Resultados de Buenas Prácticas de Manufactura.....	66
5. Crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> evaluando efecto de temperatura empaque vacío.....	69
6. Crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> evaluando efecto de temperatura empaque granel.....	70
7. Crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> evaluando efecto de empaque a temperatura 5°C	71
8. Crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> evaluando efecto de empaque a temperatura 25°C	72
9. Crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en vacío a 5° C en el tiempo de almacenamiento	73
10. Crecimiento <i>Listeria monocytogenes</i> en vacío a 25° C	74
11. Crecimiento <i>Listeria monocytogenes</i> en empaque a	

granel a 5°C.....	75
12. Crecimiento <i>Listeria monocytogenes</i> a granel a 25°C.....	76
13. Resultados de humedad en empaque a Granel	77
14. Resultados de humedad en empaque a Vacío	78
15. Resultados de pH en empaque a Vacío	79
16. Resultados de pH en empaque a Granel	80
17. Preparación de Inóculo de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932	120
18. Procedimiento Metodología analítica B.A.M. <i>online</i>	121
19. Proceso de la elaboración de la salchicha	128
20. Fermentación de azúcares	133
21. Movilidad (sombriilla)	134
22. Lectura e interpretación de la Galería de API <i>Listeria</i>	135
23. CAM Test	136

ABREVIATURAS

- AESAN:** Asociación Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.
- AFSSA:** Agence Francaise de Securité des Aliments. (Agencia Francesa de Seguridad de los Alimentos).
- ASICARNE:** Asociación Salvadoreña de Industriales Cárnicos.
- ATCC:** American Type Culture Collection.
- B.A.M:** Bacteriological Analytical Manual. (Manual de Análisis Microbiológicos de la Administración de Drogas y Alimentos).
- BPM:** Buenas Prácticas de Manufactura.
- CIDRAP:** Center for Infectious Disease Research & Policy.(Centro de Investigación y Políticas de Enfermedades Infecciosas).
- CONACYT:** Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología.
- CONAMYPE:** Comisión Nacional de la Micro y Pequeña Empresa
- EFSA:** Autoridad Europea para la Seguridad de Alimentos.
- FAO:** Food and Agriculture Organization. (Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura).
- FSIS:** Food Safety and Inspection Service. (Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos)
- GTZ:** Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit. Cooperación Alemana para el Desarrollo.
- H.A.C.C.P:** Hazard Analysis and Critical Control Points. (Análisis de Riesgos e Identificación y Control de Puntos Críticos).

- ICMSF:** International Commission on Microbiological Specification for food. (Comisión Internacional sobre especificaciones Microbiológicas para los alimentos).
- IICA:** Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- IPOA:** Oficina de Inspección de Productos de Origen Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- LPC:** Alimento Listo para Consumir.
- OMS:** Organización Mundial para la Salud.
- QAC:** Compuestos de Amonio Cuaternarios
- RAM:** Reacciones Adversas a los Medicamentos
- RTE:** Ready to Eat. (Listo para Consumir).
- TLC:** Tratado de Libre comercio.
- UFC:** Unidad Formadora de Colonia.
- USDA:** United States Department of Agriculture. (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos).

RESUMEN

La detección de *L.monocytogenes* en alimentos como las salchichas, reviste gran importancia por los diversos brotes de enfermedad que han ocasionado hospitalizaciones, abortos y fallecimientos y que han sido asociados al consumo de Hot-dogs. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de empaque y temperatura de almacenamiento en la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en salchichas producidas artesanal. Para cual las salchichas producidas para la realización de esta investigación fueron inoculadas artificialmente con cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC13932 a una concentración equivalente a 100UFC/mL. Luego fueron empacadas a vacío y a granel y almacenadas a las temperaturas de 25°C y 5°C. Durante los períodos de tiempo de 0,1,2,4,8,16 y 32 días. Para la detección y cuantificación de la bacteria se utilizó la metodología tradicional del BAM online cap. 10. 2011. La identificación bioquímica mediante API Listeria, prueba CAM y fermentación de azúcar. El procesamiento de la información se realizó mediante el paquete estadístico SPSS para Windows v10, el análisis de varianza (ANOVA) determinó diferencias significativas a un nivel de confianza de 95 % en los grupos, y prueba Tukey para conocer entre cuales grupos existió la diferencia y para determinar la relación entre el crecimiento de *L.monocytogenes* y el tiempo de almacenamiento se utilizó el modelo estadístico Racional Curve Expert v2.2. Los resultados demostraron que las condiciones de almacenamiento y empaque especificadas en este estudio, no fueron limitantes para evitar la supervivencia y crecimiento de *Listeria monocytogenes*, además el crecimiento se mantuvo durante la vida útil establecido para este producto. Concluyéndose que los alimentos deben ser elaborados observando las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y la implementación del sistema de control de puntos críticos de control (HACCP).

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCIÓN

La listeriosis transmitida por alimentos es una enfermedad relativamente poco común, pero grave, con tasas de letalidad altas (20-30%), comparadas con las de otros microorganismos patógenos. (FAO/OMS, 2004).

La bacteria responsable, *Listeria monocytogenes* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza donde puede sobrevivir por largos periodos de tiempo. El mayor peligro como fuente de contagio para el hombre son los alimentos listos para el consumo, especialmente los que se conservan refrigerados por periodos prolongados. En la industria alimentaria el patógeno sobrevive a los procesos de limpieza e higienización por su capacidad de formar biofilm sobre superficies de trabajo y equipos, contaminando los alimentos que allí se procesan. (Schöbitz, 2009).

Una de las mayores preocupaciones en seguridad de alimentos es la recontaminación de productos listos para consumir (LPC) o en alimentos precocidos que hayan tenido algún tratamiento térmico, como es el caso de salchichas tipo Hot-dog que en 1998 originó uno de los brotes más grandes ocurridos en la historia. El resultado 15 adultos muertos, 6 abortos y más de 1 millón de libras de producto retirado del mercado. (Cutter, 2003).

Entre los últimos brotes de listeriosis ocurridos destacan por su importancia el que tuvo lugar en Canadá en el 2008. El brote se originó en la fábrica Maple Leaf Foods. Se cree que alrededor de 220 productos presentaron contaminación de *L.monocytogenes* dando lugar a 57 casos de listeriosis y 23 decesos. (CIDRAP News, 2008).

Considerando que las salchichas para Hot-dogs han sido catalogado como un alimento de riesgo por el número de brotes en los que han estado implicados y cuyo agente causal ha sido *Listeria monocytogenes*. La capacidad que manifiesta esta bacteria para sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados aun en condiciones adversas en el ambiente y en el interior o superficie del alimento; así como crecer a temperaturas muy bajas (2 a 4°C). (Figuera, 2005).

Este estudio tuvo como finalidad evaluar el efecto del empaque y temperatura de almacenamiento en la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en salchichas producidas en una planta artesanal situada en Apopa.

Para lo cual las salchichas fueron contaminadas artificialmente con dilución 10^6 UFC/mL (equivalente a 100 UFC/mL) de una cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC13932, luego fueron empacadas a granel y vacío y almacenadas a temperaturas de 5°C y 25°C.

La frecuencia para las determinaciones analíticas, fueron establecidas tomando en consideración el tiempo que transcurre desde su elaboración hasta el momento en el cual se observó pérdida de características sensoriales lo que indicó la caducidad de los productos.

Obteniéndose que bajo las condiciones de almacenamiento especificadas en este estudio para las salchichas de Hot-dogs, el empaque a vacío y granel y las temperaturas de 25 y 5°C no fueron limitantes para la supervivencia y crecimiento de *Listeria monocytogenes*, manteniéndose durante el período de vida útil del producto.

Demostrándose que los alimentos deben ser elaborados observando las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) ya que *Listeria monocytogenes* puede sobrevivir y permanecer viable hasta el momento en que el producto sea consumido aun mantenidas en condiciones adecuadas de almacenamiento.

Por lo que se reafirma la importancia de cumplir con los principios Generales del CODEX, que especifican que quienes se dedican a la elaboración de alimentos deben controlar los peligros alimentarios mediante el uso de sistemas de gestión de la calidad como el Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos (HACCP). Para obtener alimentos que no pongan en riesgo la salud de los consumidores.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del empaque y temperatura de almacenamiento en la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en salchichas artesanales.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Comprobar el grado de cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura en la planta artesanal procesadora de las salchichas utilizadas para la investigación.

2.2.2 Evaluar el efecto del, empaque a vacío y granel en temperaturas de almacenamiento de 5 y 25°C en la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en salchichas.

2.2.3 Determinar la relación entre la cantidad de *Listeria monocytogenes* y el tiempo de duración de las salchichas mantenidas a temperatura ambiente y en refrigeración.

2.2.4 Verificar los cambios de humedad y pH de las salchichas en los diferentes tiempos y condiciones de almacenamiento.

Hipótesis:

En salchichas producidas para la investigación, el empaque al vacío y temperatura de almacenamiento de refrigeración de 5°C inhibe el crecimiento de *Listeria monocytogenes* durante su vida útil.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

Antecedentes de la Industria Cárnica en El Salvador

La industria cárnica salvadoreña se remonta a principios del siglo XIX tiempo durante el cual se trabajaban los embutidos de una forma totalmente artesanal, uno de los lugares pioneros en la producción de estos es la ciudad de Cojutepeque.

Con el tiempo esta industria fue tomando auge de tal forma que se convirtió de una forma artesanal a una más industrializada principalmente en el área metropolitana. (Avalos, 2003).

La oficina de Inspección de productos de origen animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería (IPOA) y la Asociación Salvadoreña de Industriales Cárnicos (ASICARNE), contabilizan once empresas procesadoras y comercializadoras debidamente registradas, las cuales generan según la temporada (diciembre) una producción de 544000 a 680000 Kilogramos de embutidos mensualmente, lo que representa una producción anual promedio alrededor de 7630 TM. Estimándose, además, la existencia de aproximadamente 1000 embutidoras artesanales.

Con la apertura de los Tratados de Libre Comercio (TLC), la industria cárnica Salvadoreña se ve en la necesidad de mejorar sus estructuras organizativas, procesos de producción, comercialización, y distribución de sus productos, para cumplir con los requisitos de calidad exigidos, y demostrar que se cuenta con un sistema de trazabilidad de los lotes producidos. Para poder incursionar a otros mercados. (Avalos, 2003).

PROPIEDADES DE LA CARNE Y LOS PRODUCTOS CÁRNICOS

La carne es un excelente medio de cultivo para toda clase de microorganismos debida a la elevada cantidad de nutrientes, pH cercano a la neutralidad (6 – 6.5) y una actividad de agua igual o superior a 0.98. Bajo estas condiciones, prácticamente todos los microorganismos son capaces de crecer, incluidos los patógenos. (Mouwen, 2009).

Durante los procesos de obtención de la carne, ésta puede contactar con la piel de los animales sacrificados, su contenido estomacal y entérico, el equipamiento y utensilios del establecimiento, las manos y ropas de los operarios, el agua utilizada para el lavado de la canal y del equipo, el aire de las zonas de procesado y de almacenamiento. Consecuencia de ello es la presencia de células microbianas en la superficie de la canal, en superficies de músculo y grasa previamente estériles.

La flora inicial en el momento del sacrificio es muy amplia, procediendo bien de las superficies y tracto gastrointestinal del animal (*Bacillus*, *Clostridium*, *Brochothrix*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacilos*, etc.), o del hombre (*Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*), o bien del entorno (*Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Aeromonas*, *levaduras*).

Sin embargo, el almacenamiento a bajas temperaturas seleccionará un grupo limitado de microorganismos aerobios psicrotrofos, especialmente microorganismos de los géneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Psychrobacter*. Entre las bacterias que pueden poner en peligro la salud pública se encuentran los patógenos *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter spp*, *Clostridium perfringens* y *Listeria monocytogenes*. (Mouwen, 2009).

Es por ello que, desde el momento del sacrificio hasta la llegada del producto final al consumidor, deben mantener una serie de condiciones que impidan el crecimiento de microorganismos patógenos y retrasen al máximo el crecimiento de otros que, sin serlo, pueden alterar las características organolépticas o la apariencia del producto, o ambas cosas a la vez, haciéndolo inaceptable para su consumo y que además pueda significar un riesgo para la salud del consumidor. (SENASICA).

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) define a los embutidos como: Productos elaborados en base a una mezcla de carne de res y/o carne de cerdo, adicionada o no de despojos comestibles, grasa de cerdo, condimentos, especias y aditivos alimentarios, uniformemente mezclados, con agregados o no de sustancias aglutinantes y/o agua helada o hielo, introducidas en tripas naturales o artificiales y sometidas o no a uno o más de los procesos tecnológicos de curado, cocción y ahumado. (NSO. 67.02.13:98)

CLASIFICACIÓN DE EMBUTIDOS

Existe una gran variedad de productos cárnicos llamados “embutidos”. Una forma de clasificarlos desde el punto de vista de la práctica de elaboración, reside en referir al estado de la carne al incorporarse al producto. En este sentido, los embutidos se clasifican en:

Embutidos crudos: aquellos elaborados con carnes y grasa crudos, sometidos a un ahumado o maduración. Por ejemplo: chorizos, salchicha desayuno, salames.

Embutidos escaldados: aquellos cuya pasta es incorporada cruda, sufriendo el tratamiento térmico (cocción) y ahumado opcional, luego de ser embutidos. Por ejemplo: mortadelas, salchichas tipo Frankfurt, jamón cocido, etc. La temperatura externa del agua o de los hornos de cocimiento no debe pasar de

75 - 80°C. Los productos elaborados con féculas se sacan con una temperatura interior de 72 - 75°C y sin fécula 70 - 72°C.

Embutidos cocidos: cuando la totalidad de la pasta o parte de ella se cuece antes de incorporarla a la masa. Por ejemplo: morcillas, paté, etc. La temperatura externa del agua o vapor debe estar entre 80 y 90°C, sacando el producto a una temperatura interior de 80 - 83°C. (OEA/GTZ, 2003).

Salchicha

Es el embutido elaborado en base a una carne de res, de cerdo o de aves de corral, como constituyente principal, y de otros animales de consumo autorizado, grasa de cerdo, sustancias aglutinantes, agua o hielo, especias y aditivos alimentarios; adicionada de hortalizas, hierbas aromáticas y otros vegetales crudos o cocidos, autorizados por el organismo competente; adicionada o no de trozos de grasa dura de cerdo, que permanecen enteros distribuidos en la mezcla anterior, sometida a cocción; y sometida o no a los procesos de curado y ahumado. (Romano, 2012).

Los “Frankfurters” (llamadas también “hot-dog”, salchicha de Viena o mortadela) son salchichas completamente cocidas y/o ahumadas de acuerdo a los estándares federales de identidad. Los estándares federales de identidad describen los procedimientos que los procesadores deben seguir al formular las recetas y poner al mercado los productos de carne, ave y huevos. Los productos terminados tienen forma de extensores y vienen en todos los tamaños (cortos, largos, delgados y gruesos). (USDA).

La categoría más popular de todas es la variedad sin pellejo que son las que sus fundas han sido peladas después de cocidas. Se puede usar hielo o agua, o ambos, para facilitar la molienda, la mezcla o la disolución de los ingredientes del curado. Los productos acabados no deben contener más de 30 % de grasa,

ni 10 % de agua, o no más de una combinación de 40 % de grasa y agua añadida. Se puede usar un máximo de 3.5 % de aglutinantes y extensores no cárnicos (tales como leche sin grasa en polvo, cereal o leche entera en polvo) o se puede usar 2 % de proteína de soya aislada pero deben ser mencionados en la etiqueta por su nombre común en la lista de ingredientes. (USDA).

Procesos involucrados en la elaboración de salchicha

El proceso de elaboración de la salchicha, es una secuencia de eventos en la cual cada paso es una parte integral de todo el proceso, por lo tanto es poco práctico considerar cada paso por separado o dar más importancia a una sola parte del proceso.

Molido: Los trozos de músculo de diferentes tamaños y formas, y con diferente composición en grasa y tejido conectivo son molidos o cortados hasta lograr la formación de partículas de tamaño uniforme. El grado de molido dependerá del tipo de producto que se quiera obtener. (Armenta, 2006).

Mezclado: El mezclado se lleva a cabo en una cortadora (cutter) en la cual se conjugan los procesos de molido, formación de la emulsión e incorporación del resto de ingredientes. El típico procedimiento consiste en picar los trozos de carne agregándole a su vez cierta cantidad de sal (hasta un 4% en algunos casos), para lograr una buena extracción de proteínas miofibrilares y así poder lograr una buena estabilidad de emulsión y un buen gel. Durante todo el proceso de mezclado, la temperatura no debe de exceder los 10-12°C para mantener la funcionalidad de dichas proteínas. Para lograr este fin, el proceso debe de realizarse en cuartos fríos y/o con la adición de hielo (que también tiene la finalidad de ajustar la humedad del producto). Posteriormente el resto de los ingredientes son agregados. Durante el mezclado se deben evitar que el tiempo de cortado exceda los 3-4 minutos, lo que ocasionaría la formación de

fracciones pequeñas de proteína que no presentarán funcionalidad, pudiéndose presentar la separación de fases (rompimiento de la emulsión) durante el cocinado.

Una vez que la emulsión ha sido formada la pasta se encuentra en un punto crítico. El manejo excesivo, y/o el aumento de temperatura, y/o demoras de tiempo entre el siguiente proceso pueden reducir su estabilidad. (Armenta, 2006).

Embutido: La pasta o masa cruda es un producto intermedio que a través del tratamiento por calor adquiere las características del producto final. Para el proceso de calentamiento la masa, que es viscosa y posee capacidad para fluir, requiere de una funda que es la que determina la forma final del producto.

Para el proceso de embutido existen dos tipos de embutidoras, las de pistón y la continua, siendo la primera la más común. Esta consiste esencialmente de un barril o cilindro el cual tiene un plato movable que es empujado generalmente por la presión del aire e impulsa la masa a través del barril, para luego pasar al cuerno de embutido cuyo tamaño dependerá del tipo de funda que se vaya a utilizar. (Armenta, 2006).

Seccionado y amarrado: Una vez que la pasta ha sido embutida dentro de la funda, ésta es seccionada en tramos de 10-12 cm con grapas de metal o tiras de cáñamo. En el caso de salchichas pequeñas, como la tipo Frankfurt, la división de las salchichas se logra girando la funda para lograr la división de la misma y así formar la salchicha. Esta operación se puede realizar a mano o mecánicamente. (Armenta, 2006).

Tratamiento térmico: La finalidad del tratamiento térmico es: 1) consolidar la estructura proteica característica del embutido, 2) disminuir la carga bacteriana al producto, 3) conferirle las características sensoriales deseadas.

Este tratamiento térmico se puede realizar de dos maneras, usando agua como medio de transferencia de calor o aire húmedo.

Para el proceso de horneado se recomienda un calentamiento escalonado para evitar la súbita desnaturalización de las proteínas, lo cual traería como consecuencia una pérdida de su funcionalidad debido a su agregación. Durante el proceso de horneado se pueden distinguir dos grandes etapas: la primera es lograr una temperatura interna del producto de 54-55°C para lograr una buena gelificación y la segunda es la de lograr una temperatura interna de 72°C con el fin de obtener un producto pasteurizado. (Armenta, 2006).

Enfriamiento y empacado: Después del tratamiento térmico el producto se sumerge en agua fría para después pasarse al almacenamiento en refrigeración. El proceso de enfriado tiene como finalidad, 1) la formación de un mejor gel y por ende de un mejor producto y 2) para lograr un choque térmico realizando con esto el proceso de pasteurización. Después que las salchichas han sido apropiadamente enfriadas, la funda de celulosa es removida, proceso conocido como “pelado”. Las salchichas una vez peladas se ponen en paquetes de peso variable, lo cual estará en función de la presentación del producto y de las especificaciones del fabricante. (Armenta, 2006).

ALTERACIONES DE LOS PRODUCTOS CARNICOS

Se considera como micro biota alterante a aquellos microorganismos que al crecer sobre los alimentos degradan sus componentes de forma que cambian sus propiedades organolépticas, modificando sabor, olor, textura o color, haciéndolos inaceptables para su consumo. Los microorganismos alterantes de cada alimento son, en general, los que constituyen su propia y característica microbiota. Ésta puede variaren cada fase del proceso de producción y/o almacenamiento siendo, finalmente, el resultado de la interacción de los

microorganismos existentes en el alimento crudo y de los procesos de producción, conservación y almacenamiento del mismo.

En productos cárnicos cocidos o escaldados las alteraciones son algo distintas a las de la carne fresca debido al tratamiento térmico y su procesado, por los que la carga microbiana queda reducida a valores comprendidos entre 10^1 y 10^4 UFC/g, apareciendo en bajas concentraciones microorganismos como *Pseudomonas*, bacterias lácticas, levaduras y enterobacterias. Su alteración durante la refrigeración es similar a la de la carne fresca refrigerada pero más lenta, y pueden aparecer exudados, limo o viscosidad superficial, producción de gas, oxidación o enverdecimiento, aparición de olores y sabores anómalos, y procesos como acidificación, agriado y putrefacción. (Sánchez, 2012).

En el cuadro N°1 se mencionan a los principales microorganismos aislados de la carne y de los productos.

Cuadro N° 1. Bacterias patógenas aisladas de cárnicos. (Menéndez, 2012).

Microorganismo	Carne fresca	Productos cárnicos
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++
<i>Salmonella spp.</i>	++	++
<i>Listeria monocytogenes</i>	++	++
<i>Campylobacter spp.</i>	++	+
<i>Escherichia coli</i>	++	+
<i>Aeromonas spp</i>		+
<i>Bacillus cereus</i>		+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	++	+
<i>Clostridium perfringens</i>	++	+
<i>Clostridium botulinum</i>	+	++
+: se especula que sean un posible riesgo; ++: aislado frecuentemente y/o implicado en brotes documentados		

Los tipos de microorganismos y la cantidad de ellos, presentes en los productos elaborados con base en carne, dependen de las condiciones sanitarias del medio ambiente del cual provenga el alimento, de las propiedades y calidad

microbiológica de algunos ingredientes adicionados, del cuidado de quien procesa y maneja el producto y de las condiciones posteriores de almacenamiento, manejo y distribución del mismo. (Restrepo, 2001).

Factores que afectan la vida de anaquel de salchichas

Los alimentos son perecederos por naturaleza, numerosos cambios toman lugar en ellos durante su elaboración y almacenamiento. Es bien conocido que las condiciones a las cuales se procesa y almacena un alimento pueden influir en los atributos de calidad de los mismos. Durante el tiempo de almacenamiento, uno o más atributos de calidad pueden verse afectados. Es aquí cuando el alimento es considerado no apto para consumo y por lo tanto se dice que ha alcanzado su vida de anaquel. (Mendoza, 2013).

La vida útil (VU) es un período en el cual, bajo circunstancias definidas, se produce una tolerable disminución de la calidad del producto. La calidad engloba muchos aspectos del alimento, como sus características físicas, químicas, microbiológicas, sensoriales, nutricionales y referentes a inocuidad. En el instante en que alguno de estos parámetros se considera como inaceptable el producto ha llegado al fin. (Mendoza, 2013).

Los factores que influyen en la vida útil de anaquel de un producto son: La formulación y la estructura del producto, actividad de agua, pH, acidez total, oxígeno disponible, nutrientes, carga bacteriana inicial, humedad relativa, exposición a la luz, composición de la atmósfera dentro del empaque. (Mendoza, 2013).

El uso de las envolturas para la protección de embutidos tiene algunas ventajas Como son: los largos periodos de conservación, calibrado uniforme, resistente al ataque bacteriano, resistente a la rotura, algunas impermeables, otras permeables a gases y humo, son no tóxicas, algunas comestibles (colágeno),

algunas contráctiles (se adaptan a la reducción de la masa cárnica), facilidad de pelado. (Mendoza, 2013).

Preservación de productos cárnicos

Una de las opciones para preservar la vida útil de un producto perecedero como los productos cárnicos es el vacío el cual consiste en extraer el aire del interior del empaque, con lo cual ganaremos tiempo de conservación ya que retardamos el proceso natural de descomposición del producto. Los alimentos empacados al vacío mantienen su frescura y sabor de 3 a 5 veces más tiempo que con los métodos convencionales. Los alimentos frescos mantienen su textura y apariencia natural. Los alimentos que se guardan en el congelador no se queman, ya que no están expuestos al aire frío, no se deshidratan ya que al no haber aire, se mantiene la humedad natural de los comestibles. (Sánchez, 2012).

El envasado a vacío, implica sencillamente la eliminación del aire dentro del envase en el que se encuentra el alimento, sin que sea reemplazado por otro gas, y suele dejar una presión residual de unos 10 mm Hg. Se emplea en muy diversos productos, como carnes frescas o curadas, quesos, etc. Su principal limitación es que la aplicación de vacío puede provocar la deformación del producto. Además, al continuar las actividades respiratorias de los tejidos del producto (como por ejemplo en la carne y vegetales) durante el almacenamiento, se va a ir produciendo un aumento de la concentración de dióxido de carbono y de vapor de agua en el interior del envase, produciéndose un cambio de color (pardea miento) y la acumulación de exudado. (Sánchez, 2012).

Desde el punto de vista de salud pública, preocupa el comportamiento de las bacterias patógenas capaces de multiplicarse en condiciones reducidas de oxígeno. En alimentos envasados en atmósfera modificada son especialmente

importantes las bacterias psicotrófas anaerobias y anaerobias facultativas entre las que destaca *L.monocytogenes* y otras, que se pueden multiplicar a temperaturas inferiores de 5°C. Hay que señalar, además, que bacterias mesófilas como *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* y otros, pueden multiplicarse en atmósfera modificada si fluctúa la temperatura. Este hecho no es infrecuente, especialmente en los expositores y en los frigoríficos domésticos e incluso cuando se controla adecuadamente la temperatura por que se producen aumentos cíclicos de la misma durante el desescarhe.

Las bacterias patógenas, como *L monocytogenes* prácticamente no se ve afectada cuando la concentración de CO₂ no supera el 50%. Esto es importante porque al aumentar la vida útil puede multiplicarse hasta niveles peligrosos antes de que los microorganismos alterantes hayan alcanzado valores asociados con la alteración y, por tanto, un alimento “aparentemente fresco” pueda resultar peligroso. (García).

El riesgo de los productos cárnicos Listos para Consumir (LPC)

Los datos estadísticos de monitoreo de FSIS desde 1993 a 1999 sugieren que los hot-dogs y las carnes para almuerzo están particularmente relacionados como vehículos de *L monocytogenes*, sobrevivientes al procesado o contaminantes post-procesado y con capacidad de multiplicarse a temperaturas de refrigeración. En 2005 se detectó un incremento en la incidencia de *L.monocytogenes* en carne y productos cárnicos, principalmente en productos LPC; de tal manera que el control de este patógeno se ha convertido en un reto, ya que se requiere inhibir su crecimiento, pero al mismo tiempo mantener la calidad y frescura de estos productos dada la preferencia del consumidor. (Marcos, 2008).

Los alimentos que no requieren tratamiento culinario alguno antes de ingerirse (quesos, salami, salchichas Frankfurt, pates, etc.) constituyen un alto riesgo de contaminación listeriósica para ciertas industrias alimentarias y para los productos que fabrican. Dada su naturaleza estos productos deben mantenerse siempre bajo condiciones de frío (2-4 °C) hasta el momento de su consumo. Se ha visto en varias ocasiones que el 20-25% de los frigoríficos domésticos presentan temperaturas de 10 °C, con lo que los alimentos que contienen no alcanzan temperaturas de refrigeración en su punto de enfriamiento más tardío. Por tanto, la refrigeración doméstica proporciona un ambiente donde *L.monocytogenes* compite, con éxito, contra los microorganismos mesófilos antagonistas.

El desarrollo de *L.monocytogenes* en los productos cárnicos depende del pH, tipo de carne (magra o grasa), tipo y cantidad de micro flora originaria, temperatura a la que han estado expuestas y presencia o ausencia de conservantes. (Domínguez)

Los microorganismos deteriorativos son capaces de multiplicarse hasta rangos peligrosos durante los periodos de abuso de temperatura y llegan a deteriorar los alimentos provocando cambios organolépticos que actúan como señal que evita su consumo, en tanto que la presencia de patógenos puede pasar desapercibida, pues no siempre desarrollan señales sensoriales que pudieran alertar al consumidor. Cualquier célula psicrotrofica sobreviviente al tratamiento térmico puede crecer más rápidamente que la microbiota de descomposición durante el almacenamiento en refrigeración. (Mendoza Guzmán).

En productos cárnicos los tratamientos del procesamiento, en general, reducen el número de bacterias, pero solo el tratamiento de esterilización en latas, elimina completamente los microorganismos. El procesamiento puede también introducir microorganismos adicionales y seleccionar el tipo que puede proliferar

y causar daño durante el almacenamiento. Además, puede también involucrar el uso de ingredientes no cárnicos que pueden servir como nutrientes o inhibidores para el crecimiento microbiano. (Restrepo, 2001).

Esto es muy preocupante para la industria cárnica puesto que la principal causa de disminución de la vida de anaquel es el crecimiento de bacterias psicotróficas. Además debe considerarse el crecimiento de patógenos que presentan crecimiento acelerado entre 7 y 10°C y moderados entre 5 y 7°C tales como *Listeria monocytogenes*.(Tirado, 2005).

Todavía se desconoce la dosis infectiva de este agente para el hombre. Es importante destacar, que si *L.monocytogenes* está presente en el alimento, aunque se desconozca en qué cantidad, representa un riesgo considerable especialmente para personas que pertenecen a los grupos de riesgo, ya que es un microorganismo con considerable patogenicidad y alta tasa de mortalidad. (Pérez, 2013).

L.monocytogenes, es una bacteria ampliamente difundida en la naturaleza. Su presencia en los alimentos está determinada por su extensa distribución en el ambiente, tierra, agua, servidas, material fecal, vegetación, ensilados y entorno de la producción de alimentos. Lo que confiere una importante oportunidad para contaminarlos. (Michanie, 2004).

Diferentes productos estudiados en Australia, arrojaron datos de esta bacteria en carnes procesadas y empacadas al vacío. Piner, R, realizó una extensa revisión de este patógeno en diversos tipos de carnes y demostró su presencia en muestras de carne aves, res, cerdo, cordero, embutidos y en productos cárnicos ya procesados. Tobia, M.B. et al., en 1997, investigaron la presencia de *Listeria spp* y *L.monocytogenes* en embutidos termoprocesados, empacados al vacío, conservados en frío y consumidos sin ningún proceso decocción o con

mínimo calentamiento como salchichas tipo viena, mortadela, salchichón con jamón, provenientes de diferentes mercados; y en las cuales un 23 % de aislados fueron identificados como género *Listeria*, de las cuales 16.6% fueron tipificadas como *L. monocytogenes*. Esta incidencia se presentó probablemente debido a una contaminación post-proceso o proceso térmico insuficiente de las muestras. (Sánchez 2003).

Generalidades sobre *Listeria monocytogenes*

El género *Listeria spp* recibe su nombre en honor al cirujano británico Lord Joseph Lister y la especie *L.monocytogenes* por el síndrome de monocitosis presente en algunos enfermos de listeriosis.

En 1891, el investigador Francés Hayen. Describió por primera vez unos organismos pequeños Gram positivos en forma de vara aislados de tejidos humanos. Dos años más tarde, en Alemania, Henle aisló unos organismos muy similares a los descritos por Hayen. En 1991 Hülphers describió de nuevo estos organismos aislándolos de focos necróticos de hígado de conejo y los denominó *Bacillus hepatis*.

La caracterización completa de estos organismos fue realizada por Murray y Col. (1926). El microorganismo fue aislado a partir de conejos y cobayas de laboratorio infectados que desarrollaron lesiones hepáticas y monocitosis pronunciadas. A partir de este momento el microorganismo fue denominado *Bacterium monocytogenes*. Poco tiempo más tarde Pirie (1940) logro aislar este microorganismo Gram positivo que llamó *Listerella hepatolítica*. (Martí, 2002).

La primera descripción de listeriosis en los humanos fue realizada por Nyfeldt en 1929, el cual aisló la bacteria de sangre de pacientes que sufrían de una enfermedad parecida a la de la mononucleosis infecciosa. En 1936, Burn, aisló este microorganismo de cadáveres de neonatos e implicó a la bacteria como causa de meningitis en adultos. En 1936 se reconoció por primera vez a *L.*

monocytogenes como causa de infección humana durante el período perinatal y como responsable de meningitis en adultos.

En 1940, y por razones taxonómicas, se adoptó la propuesta del nombre que actualmente conocemos: *Listeria monocytogenes*. (Martí, 2001).

El género *Listeria* pertenece a la familia *Listeriaceae*, clase *Bacilli*, orden *Bacillales*, *phylum Firmicutes*. (Garrity et al., 2007). *L.monocytogenes* es la única especie implicada en patología humana, e incluye bacilos cortos o cocobacilos, a veces algo curvados, gram positivos (aunque los cultivos viejos se tiñen mal), no espatulados, no encapsulados, anaerobios facultativos, con flagelos periticos (Fig N°1), móviles a 22-28 °C.



Fig N° 1 *Listeria monocytogenes* (Fuente: Food Quality news.com)

Son parcialmente hemolíticos, fermentan la glucosa y son fermentadores variables de otros azúcares, produciendo ácidos pero no gas ni sulfhídrico. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30-37 °C, pero pueden crecer en un rango de temperaturas entre 0.4 y 45 °C. Pueden crecer en un amplio rango de pH entre 4.5 y 9.2, el valor limitante de actividad de agua para su crecimiento es de 0.93, soportan la congelación y toleran altas concentraciones de sal hasta un 25%.(Sánchez, 2012).

Cuadro No.2 Factores que impactan en el crecimiento y supervivencia de la bacteria (AESAN, 2011)

Factor	Puede crecer			Puede sobrevivir, pero no crecer
	Límite inferior	Óptimo	Límite superior	
Temperatura (°C)	-1,5 a +3,0	30,0 a 37,0	45,0	-18,0
pH	4,2 a 4,3	7,0	9,4 a 9,5	3,3 a 4,2
Actividad de agua (a _w)	0,90 a 0,93	0,99	>0,99	<0,90
Concentración de sal (%)	<0,5	0,7	12 a 16	≥20
Atmósfera	Es un anaerobio facultativo que puede crecer en ausencia de oxígeno, por ejemplo, envasado a vacío o atmósfera modificada			

Adaptada de (FSAI, 2003) (UE, 2004, 2008).

Crece con 10% de CO₂ y se inhibe en medios con 70% de CO₂ y 30% de N₂, es psicrotrófico ya que puede mantenerse viable a bajas temperaturas, dan un aspecto de “sombriilla” al medio de movilidad a 20-25 °C. (Anexo Fig N°21)

Al observarlo al microscopio presenta un movimiento de deslizamiento muy particular a temperatura ambiente, semejante a un espiral, se asemeja a las corinebacterias o a los diplococos Gram positivos, en cultivos viejos se pueden apreciar estructuras filamentosas largas que miden de 6-20 µm de longitud, presentando una tinción irregular. (Tovar, 2005).

L. monocytogenes es un bacilo corto, regular, con extremos redondeados, cuerpo recto o ligeramente curvado, mide entre 0,5 -2 µm de largo, por 0,4-0,5 µm de ancho; a veces adopta forma de cocobacilo, se presenta aislado, en parejas, cadenas cortas o agrupado en “V” o en “Y”, puede agruparse también en empalizada, carece de cápsula, no es ácido alcohol resistente, y no presenta esporas. (Sánchez, 2012).

Entre sus factores de virulencia se encuentran los antígenos somáticos (O) y flagelares (H), las betahemolisinas citolíticas (listeriolisinas) y su capacidad lipolítica, siendo además capaz de crecer en el interior de las células fagocíticas

mononucleares, escapando al sistema inmune del hospedador. (Sánchez, 2012).

El género *Listeria* actualmente incluye ocho especies reconocidas, las seis especies anteriormente conocidas: *L.monocytogenes*, *L.innocua*, *L.seeligeri*, *L.welshimeri*, *L.grayi* y *L.ivanovii*, y dos nuevas especies que han sido descritas: *L. rocourtiae* y *L. marthii*. *Listeria monocytogenes* y *L. ivanovii* se consideran patógenas para los animales, y *L. monocytogenes*, patógena para los humanos. (Muñoz, 2012).

L.monocytogenes posee los antígenos O (somático termoestable) y H (flagelares termolábiles) identificados, que se usan para subdividir a ese microorganismo en varias serovariedades. (Pérez, 2013).

Cuadro N° 3 Serovariedades

SEROTIPOS	SUBTIPOS	FACTORES	VARIEDADES
Serotipo 1		Factores O	1, 2
Serotipo 2		Factores H	A, B
Serotipo 3		Factores O	2 ,4
		Factores H	A, B
Serotipo 4	Subtipo 4 ^a	Factores O	5a,b
		Factores H	A,B,C
	Subtipo 4b	Factores O	5a,c
		Factores H	A,B,C

Las seis verdaderas especies del género *Listeria* por serotificación dan origen a 17 serovariedades de acuerdo a su antígeno somático O (1-4) y 15 serovariedades de acuerdo a sus cinco antígenos flagelares o antígenos H (a-e). Se reconocen 11 serotipos (1/2 a, 1/2 b, 1/2 c, 3a, 3b, 4a, 4 ab, 4 b, 4c, 4d, y 4e). Los determinantes antigénicos de los antígenos (O) son ácidos teicoicos y

ácidos lipoteicoicos de la envoltura celular, los anticuerpos dirigidos contra antígenos (O) de *Listeria monocytogenes*, presentan reacción cruzada con algunas otras bacterias Gram positivas, como *Corynebacterium*, *Staphylococcus aureus* y con los *enterococos*. (Tovar, 2005).

Para evidenciar la actividad hemolítica de *L.monocytogenes* y como criterio de identificación se utiliza comúnmente una reacción de hemólisis sinérgica con *Staphylococcus aureus*, llamada reacción de CAMP (acrónimo de Christie, Atkins y Muench- Peterson, primeros en describir este fenómeno entre *S. aureus* y *Streptococcus agalactiae*). Esta reacción se basa en el incremento de la actividad hemolítica de *L.monocytogenes* cuando crece en la proximidad de *S. aureus*, reacción que no se produce con *L. ivanovii*. (González Zorn).

Paralelamente se ha desarrollado una reacción tipo CAMP en la que se ha sustituido a *S. aureus* por *Rodococcus equi* como bacteria marcadora. Bajo el efecto de las exosustancias que secreta esta bacterias se obtiene un incremento de la actividad hemolítica característica de *L. ivanovii*, en el que el halo externo de hemólisis parcial se lisa completamente, dando lugar a una hemólisis en forma de pala que se utiliza como criterio diferenciador de *L. ivanovii* frente al resto de Listerias.

L. monocytogenes también produce una reacción tipo CAMP con *R. equi*, pero ésta adquiere una forma redondeada, de raqueta o cerilla, en lugar de la característica forma de pala, siendo por tanto claramente distinguible de la de *L. ivanovii*. Las propiedades hemolíticas características de *L. ivanovii* se deben a que secreta una potente esfingomielinasa C, producida exclusivamente por esta especie dentro del Género *Listeria*. Figura N°23. (González Zorn).

Etiología

Es el agente etiológico de la listeriosis humana, una enfermedad transmitida por alimentos que representa un problema importante en la salud pública, debido al impacto que tiene la gravedad de sus síndromes, la incidencia residual de sus síntomas y el alto costo en hospitalizaciones, lo que origina costos elevados y una alta letalidad. También, repercute económicamente a nivel nacional e internacional, debido a la pérdida de alimentos contaminados con este microorganismo que son retirados de los mercados. (Okovic, 1997).

Causante de graves infecciones como meningitis, encefalitis, bacteriemias, septicemias, absceso cerebral o espinal, listeriosis, ponto bulbar, rombo encefalitis o meningoencefalitis. En el embarazo ocurre infección en el feto o en el recién nacido, dando origen a abortos espontáneos, muerte fetal enfermedad y muerte neonatal. Esta listeriosis afecta a grupos de población vulnerables como mujeres en estado de gravidez, niños en periodo neonatal, personas ancianas y personas con fallas en el sistema inmunológico, pero también, afecta a adultos inmunocompetentes. *Listeria monocytogenes* es causante también de infecciones no graves, como es la gastroenteritis febril que produce síntomas como diarrea, fiebre, cefalea y mialgias, con un periodo de incubación corto. (Parrilla, 2013).

Ciclo patogénico

Listeria monocytogenes es un parásito intracelular facultativo que penetra en el hospedador a través del sistema digestivo, tanto del hombre como de los animales. En los últimos años se han identificado un gran número de factores de virulencia involucrados en los pasos clave del ciclo de vida intracelular de *L.monocytogenes*. El ciclo de infección consta de cuatro etapas: introducción en la célula eucariota, evasión de la vacuola intracelular, polimerización de filamentos de actina y diseminación a la célula adyacente. Figura N°2. (Parrilla, 2013).

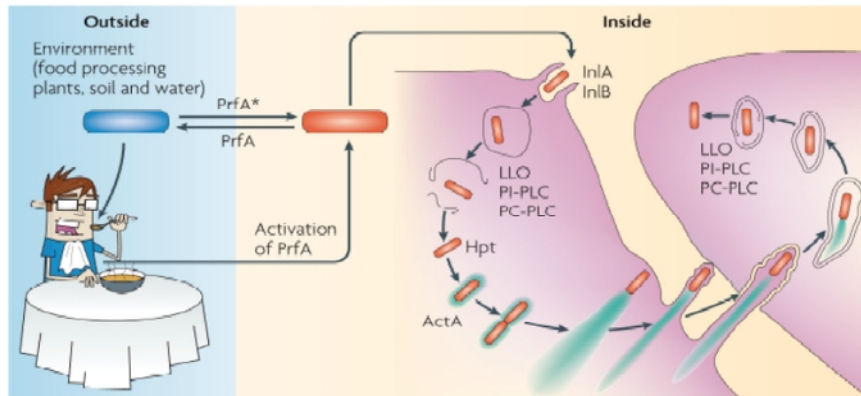


Fig N° 2 Ciclo patogénico. (Parrilla, 2013).

La bacteria penetra en el interior de la célula induciendo su propia fagocitosis, queda englobada en un fagosoma del que escapa rápidamente por la acción de la hemolisina y dos fosfolipasas; una vez en el citoplasma inicia su multiplicación y el fenómeno de motilidad intra- e intercelular por polimerización de actina; la bacteria pasa así a las células contiguas, donde reinicia un nuevo ciclo de escape del fagosoma, multiplicación intracelular y motilidad por polimerización de actina.(Parrilla, 2013).

Como patógeno *L. monocytogenes* penetra en el organismo a través de la ingesta de alimentos contaminados y atraviesa la barrera intestinal. A continuación penetra en las células del huésped y se desarrolla un ciclo patogénico intracelular consistente en fagocitosis auto inducida, lisis de la vacuola fagocítica, movilidad bacteriana inducida por la actina y diseminación a las células vecinas, con lo que se reinicia el ciclo. Para que *L. monocytogenes* transite del estado saprófito (es decir, de sobrevivir en el medio ambiente) al de patógeno intracelular y se inicie el ciclo, se requiere la activación de la proteína reguladora de la virulencia, Prf A.

El paso de la vida en el exterior al interior de la célula en el huésped mamífero se debe al activador transcripcional PrfA, que regula la expresión de varios genes requeridos para la virulencia bacteriana. En el exterior la PrfA tiene una baja actividad y se corresponde con niveles bajos de expresión génica de la virulencia. En el interior la Prf A pasa a estado activado Prf A* e induce la expresión de los genes necesarios para la invasión de la célula huésped (interlaninas Lnl A y Lnl B), lisis del fagosoma (listeriolisina O o LLO), fosfatidilinositol específico de fosfolipasa C (PI-PLC) y fosfatidilcolina (PC-PLC), crecimiento intracelular (hexosa-6-fosfato transportador o Hpt) y propagación célula a célula (proteína inductora de actina o Act A). (Parrilla, 2013).

Virulencia

Hoy se sabe que no todas las cepas de *L. monocytogenes* son patógenas. Se ha observado variabilidad en la virulencia (grado de patogenicidad de la bacteria) dentro de la especie *L. monocytogenes* y éste concepto va ganando reconocimiento. Se ha demostrado que hay *Listeria monocytogenes* virulentas, hipo virulentas y a virulentas. (Michanie, 2004).

La variabilidad en la virulencia de *L. monocytogenes* permite comprender el número bajo de casos a pesar de la frecuente exposición a alimentos con éste microorganismo. Entre 1994 y 1999, en EE.UU. la prevalencia de la bacteria en fiambres fue entre 4.2 y 7.8%. Por el momento la industria y los gobiernos deben tratar a todas las cepas de *L. monocytogenes* como potencialmente patógenas.(Michanie, 2004).

La patogenicidad o capacidad de un microorganismo para producir enfermedad obedece a varios factores de virulencia. En *L. monocytogenes* está influenciada por varios genes que dan lugar a factores entre ellos la hemolisina (listeriolisina O), internalinas, fosfolipasas y otros. Algunos factores de virulencia se conocen

pero se siguen estudiando y buscando otros para establecer su interacción con la susceptibilidad del huésped y dar lugar a la enfermedad. (Michanie, 2004).

La patogenicidad de *Listeria* está relacionada esencialmente con su capacidad de multiplicarse en el organismo. Es una infección más que una toxiinfección y tiene como mecanismo crucial de patogenicidad el parasitismo intracelular, lo cual implica una secuencia de eventos en el que cada factor de virulencia permite el parasitismo intracelular de este microorganismo patógeno. (Pérez, 2013).

Importancia de *Listeria monocytogenes* en la industria.

La razón principal por la que *L. monocytogenes* presenta problemas para muchos fabricantes de alimentos es que, las condiciones propias de una planta de procesamiento de carnes es decir: Pisos mojados, paredes frías y húmedas, agua estancada en la superficie del suelo áspero, suelos húmedos, drenajes etc. son propicias para el desarrollo de la bacteria.

La bacteria sobrevive también después del lavado de manos y en aerosoles en suspensiones, además los efluentes contaminados de plantas de procesamiento de alimentos, donde el organismo puede crecer, incrementan la contaminación de *Listeria* en el ambiente. (Pérez, 2013).

Listeria monocytogenes puede adherirse a todos los materiales comúnmente utilizados en la industria alimentaria, tales como el acero inoxidable, gomas y distintos tipos de materiales plásticos. El proceso de formación del biofilm es relativamente rápido; se ha observado que *L. monocytogenes* se adhiere a superficies de acero inoxidable, goma, vidrio y polipropileno en tiempos cortos de unos 20 minutos y comienza a generar material exacelular en un periodo de una hora; en 24 horas ya es capaz de haber formado un biofilm con dos capas de células sobre superficies de vidrio. La adherencia a superficies en contacto

con alimentos se produce a temperaturas de entre 4 y 45° C, siendo 18° C la temperatura óptima para la adhesión al acero inoxidable. (Orihuel, 2010).

La capacidad de *Listeria monocytogenes* para formar biofilms es considerada como un factor de importancia en relación con la supervivencia, el crecimiento y la persistencia de esta bacteria en la industria alimentaria. En general todos los microorganismos que forman y crecen en biofilms están protegidos frente al calor y el estrés ambiental, así como frente a los procedimientos habituales de limpieza y desinfección y son, por tanto, difíciles de erradicar. Por ello, gracias a la protección que *L. monocytogenes* encuentra en los biofilms, el microorganismo puede ser aislado de las superficies con frecuencia, después de las operaciones habituales de limpieza y desinfección.(Orihuel, 2010).

Los biofilm son microcolonias (Figura N° 3) constituidas por microorganismos inmersos en una matriz de exopolisacáridos, secretados por ellos mismos y que se encuentran firmemente anclados a la superficie sobre la cual se forman. La tasa de crecimiento en el interior del biofilm es lenta por lo cual requiere de una baja disponibilidad de nutrientes. Esto implica que un alto porcentaje de la población se encuentra en la fase de desarrollo estacionario, lo cual hace que sean más resistentes a la acción de agentes antimicrobianos, que en la fase de desarrollo exponencial. (Schobitz, 2009).

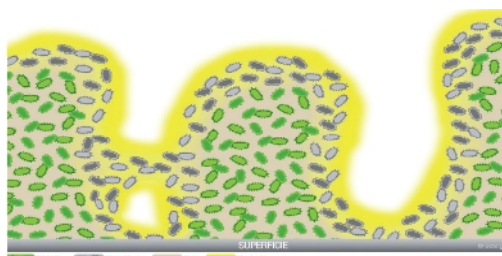


Fig N° 3 Biofilm (Orihuel, 2010).

La figura No.3 muestra la difusión de un agente antimicrobiano a través de la matriz de un biofilm. El agente antimicrobiano se representa en amarillo: a menor intensidad, menor coloración amarilla. Las células vivas se han coloreado en verde y las muertas en gris. (Orihuel, 2010).

Resistencia de *Listeria monocytogenes* a los antibióticos y sanitizantes

La resistencia a los antibióticos (RAM), fue definida por FAO/OIE/OMS (2008) como la capacidad de un microorganismo de multiplicarse o persistir en presencia de una mayor cantidad de agente antimicrobiano con relación al homólogo susceptible de la misma especie.

Hasta hace unos años, se consideraba que los aislados de *L. monocytogenes* así como las de otras *Listeria* spp, mostraban una susceptibilidad a un amplio rango de antibióticos activos contra bacterias Gram positivas. La combinación de la ampicilina con la gentamicina, era y sigue siendo recomendada como primera línea de terapia para el tratamiento de la listeriosis en humanos. No obstante, ante el reporte de la primera cepa de *L. monocytogenes* resistente a antibióticos en Francia, 1988, la posible emergencia de un patrón de resistencia dentro del género queda al descubierto. Desde entonces, la evolución de la resistencia en la bacteria ha sido considerablemente acelerada, quizás por efecto del uso indiscriminado de antibióticos que se observa hoy en día.

Una revisión de los últimos años sobre los posibles cambios en el patrón de susceptibilidad a antibióticos en *Listeria* spp, han demostrado la habilidad de desarrollar resistencia a uno o más antibióticos. Los estudios confirman que la susceptibilidad natural de *Listeria* spp y *L. monocytogenes* a los aminoglucósidos, penicilinas, quinolonas, rifampicina, trimetropin asociado a una sulfonamida (cotrimoxazole), fosfomicina y ácido fusídico, aún se mantiene en el género. Sin embargo, la incidencia de al menos una cepa resistente a la ampicilina, estreptomycin, eritromicina, vancomicina, cloranfenicol y tetraciclina,

ha sido detectada en aislados procedentes de alimentos e infecciones clínicas. (Villalobos, 2006).

Presentan una pobre actividad a las fluoroquinolonas actuales y las cefalosporinas, especialmente las de tercera y cuarta generación como cefotaxima y cefepima.

Casi todas las cepas de *L. monocytogenes* son resistentes a fosfomicina, oxacilina y linconsamidas. Se han descrito resistencias a macrólidos y a tetraciclinas en algunos aislamientos, que suelen estar codificadas por plásmidos. El Instituto Pasteur de París y la Agence Francaise de Sécurité des Aliments (AFSSA) han estudiado la sensibilidad antibiótica de cepas de *L. monocytogenes* de origen alimentario y ambiental aisladas durante 10 años (1996 2006). De las doscientas cepas aisladas, cuatro presentaban fenómenos de resistencia adquirida, dos de ellas resistentes a eritromicina y dos a tetraciclina y minociclina. (Marco, 2012).

L. monocytogenes ha desarrollado diferentes mecanismos para eludir el efecto toxico de los antibióticos y generar protección contra los compuestos químicos de los desinfectantes. Desde 1988 se viene reportando resistencia a los compuestos de amonio cuaternario, (QAC) entendiendo por resistencia en la industria de alimentos a la habilidad que desarrollan los microorganismos a sobrevivir a exposiciones cortas de los desinfectantes.

Una de las causas de esta tolerancia es el aumento en la frecuencia de contacto con los QAC. Por esta razón, la industria de alimentos aconseja una rotación constante de los diferentes desinfectantes, sin embargo se ha considerado que la adaptación cruzada con otros desinfectantes diferentes a QAC es responsable de reforzarla supervivencia de los microorganismos. (Ruíz 2008).

Brotos asociados a *Listeria monocytogenes*

Diversos brotes de enfermedad transmitida por los alimentos que han ocasionado hospitalizaciones, abortos y fallecimientos han sido asociados al consumo de Hot-dog y de carnes listas para comer que contienen *L. monocytogenes*. La causa de la contaminación por *L. monocytogenes* en dichos brotes fue trazada hasta la exposición y la contaminación post-letal por el patógeno.

Los productos de Hot-dog y de carnes listas para comer son ejemplos de productos RTE de carne y de aves de corral que reciben un tratamiento letal para eliminar los patógenos, pero que están expuestos posteriormente al medio ambiente durante las operaciones de pelado, loncheado y reenvasado. Si la *L. monocytogenes* está presente en los equipos utilizados para estos fines, el patógeno se puede transferir al producto mediante contacto. Estos productos son ejemplos de productos RTE de carne y de aves de corral que pueden favorecer el crecimiento de la *L. monocytogenes* durante su almacenamiento refrigerado. (FSIS, 2003).

Algunos ejemplos de alimentos en los que la contaminación ha ocurrido después del procesamiento y causado serios brotes de listeriosis incluye a las salchichas para Hot-dog. En 1998 se presentó uno de los brotes más grande de listeriosis ocurrido en la historia y fue causado por uno de los fabricantes de salchichas para Hot-dog más reconocido. El resultado: 15 adultos muertos, 6 abortos y más de 1 millón de libras de producto retirado del mercado. (Cutter, 2003).

Dada la gran diversidad de alimentos implicados, y el carácter de *L. monocytogenes* de colonizar cualquier lugar, en las últimas décadas se han ido produciendo diferentes brotes, repartidos por todo el mundo, como se muestra

en los casos de listeriosis confirmados en España y en la Unión Europea (UE) en los últimos años.

Tabla No. 1 Casos de brotes en España y Unión Europea. (Marco, 2012).

Año	Casos España	Casos UE
2005	68	1591
2006	78	1581
2007	81	1425
2008	88	1654
2009	121	1601
2010	129	1614

Como se puede observar se está produciendo un aumento ligero y progresivo de los casos de listeriosis tanto en España como en la suma de todos los países de la EU.

Analizando otros datos publicados por la (EFSA, 2012) se puede ver que los productos cárnicos fueron los que más casos positivos de *L.monocytogenes* obtuvieron, en mayor medida los elaborados con carne de cerdo y bovino (32%), seguido de pescado y productos del mar (29%), alimentos LPC (19%), carne de ave (13%), productos lácteos (12%), vegetales (10%), teniendo porcentajes muchos menores los quesos (1%). (Marco, 2012).

Entre los últimos brotes de listeriosis ocurridos destacan por su importancia el que tuvo lugar en Canadá en 2008. El brote se originó en las líneas 8 y 9 de producción de deli meats de la fábrica de Maple Leaf Foods. Se cree que alrededor de 220 productos presentaron contaminación de *L. monocytogenes* dando lugar a 57 casos de listeriosis y 23 decesos.

Más reciente que el anterior brote ha sido el que tuvo lugar en EE.UU. en julio de 2011. El brote se originó por el consumo de melones cantaloupe contaminados procedentes de la compañía Jensen Farms de Colorado. Se cree que fue producido por malas condiciones en el envasado. Se produjeron 123 casos repartidos en 26 estados de EE.UU., de los cuales 25 fallecieron. (Marco, 2012).

Programas de control

En 2001, la FDA y el FSIS publicó el proyecto de "Evaluación cuantitativa del riesgo relativo a la Salud Pública de Transmisión Alimentaria *Listeria monocytogenes* entre Categorías seleccionadas de Ready-to-eat."

Esta evaluación de riesgos indica que las carnes frías y Hot-dogs plantea el mayor riesgo en la relación enfermedad / muerte por *L.monocytogenes* En febrero de 2002, el FSIS inició la "Evaluación de Riesgo para *Listeria monocytogenes* en Deli Meats."

En esta evaluación de riesgos FSIS indicó que el uso de una combinación de métodos de intervención para el control de *L.monocytogenes* en carnes frías expuestas al medio ambiente después del tratamiento letal tiene el mayor impacto en la reducción del riesgo de enfermedad o muerte por *L.monocytogenes*. La Agencia utiliza estas evaluaciones de riesgos como los recursos en el desarrollo de las regulaciones para el control de *L.monocytogenes* en RTE de carne y productos avícolas. (FSIS, 2003).

FSIS *Listeria* Guide line: (Requirements of the *Listeria* Rule 2012)

El reglamento definitivo para el control de *Listeria monocytogenes* (9CFR430) incluye tres estrategias alternativas que los establecimientos pueden aplicar al procesamiento de productos RTE de carne y aves de corral durante su exposición post-letal.

De acuerdo con la primera alternativa, el establecimiento aplica un tratamiento post-letal y un agente o proceso antimicrobiano para controlar la *Listeria monocytogenes*. La segunda alternativa, el establecimiento aplica bien un tratamiento post-letal o bien un agente o proceso antimicrobiano. Y la tercera alternativa, el establecimiento no aplica un tratamiento post-letal o un agente o proceso antimicrobiano. En su lugar, se basa en un programa de control de higiene.

Los productos fabricados de acuerdo con la primera y la segunda alternativa son formulados y procesados de modo que se elimina la *Listeria monocytogenes* o se limita su crecimiento (es decir, el número de organismos no deberá aumentar durante la vida en el estante del producto hasta un nivel que suponga un riesgo para la salud pública, ni tampoco los niveles detectables del patógeno) en caso de estar presente, y proporcionar un mayor control en comparación con la tercera alternativa que implica únicamente un control de higiene para controlar la *Listeria monocytogenes*. Por lo tanto, las garantías de control del patógeno disminuyen de la primera a la tercera alternativa, sobre la base del rigor y de la exhaustividad de los métodos de control utilizados por el establecimiento.

Los establecimientos deben identificar la alternativa aplicable a sus productos RTE sobre la base de su programa de control para la *Listeria monocytogenes*. Los establecimientos pueden decidir aplicar nuevas medidas de control y cambiar de una alternativa a otra; no obstante, deberán aplicar los métodos de control estipulados para cada alternativa específica. Cada alternativa cuenta con requisitos específicos que el establecimiento debe cumplir. (9 CFR ch. III 1-1-12 Edition)

La guía pretende ser un instrumento facilitador para el desarrollo de programas de control de *L. monocytogenes* en cada empresa e instalación. Consta de una parte teórica en la que se establece el modelo para el control de este patógeno

y una parte práctica en la que se describe un modelo de programa y las etapas para su implementación en fábrica.

Aunque el documento está centrado en *Listeria monocytogenes*, las medidas y recomendaciones dispuestas dentro de la guía también pueden ayudar a combatir otros tipos de contaminación por bacterias patógenas, como *Salmonella*. (Benlloch, 2011).

Teniendo en cuenta las limitaciones en el aporte de garantías de la inocuidad de los alimentos por medio de la inspección tradicional por muestreos y análisis de lotes, el concepto de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) ha aportado una gran mejora en la producción de alimentos inocuos.

La meta del HACCP es focalizar sobre el peligro de un determinado alimento que pueda afectar la salud pública si no es controlado y diseñar, procesar, comercializar, preparar, y usar los alimentos en condiciones que controlen los peligros. Para ser exitoso el HACCP necesita ser construido sobre las Buenas Prácticas de Elaboración y las Buenas Prácticas de Higiene, las cuales minimizan la ocurrencia de peligros en el producto y en el medio ambiente de producción. El HACCP involucra una evaluación de peligros en una secuencia de producción particular y define pasos donde las medidas de control que son críticas para la inocuidad de un producto deberían ser tomadas. También establecerá límites, procedimientos de monitoreo y acciones correctivas. Sin embargo, HACCP es específico para una planta/fábrica y no vincula directamente la efectividad de cada medida con el nivel esperado de protección de la salud, por ejemplo como una reducción en el número de enfermedades transmitidas por alimentos en un país. (ICMSF, 2006).

Los principios del HACCP son conocidos internacionalmente, en gran parte, debido a la difusión de dos importantes documentos, publicados por el NACMCF (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods,

1992), y la Comisión del Codex Alimentarius (FAO1993). En los años 90 se generaliza entre las industrias su conocimiento y empleo. Esto se debe por una parte a las exigencias legislativas y por otra al convencimiento cada vez mayor de que un mejor control de la higiene y seguridad de los alimentos mejora la posición empresarial de competencia, tanto nacional como internacional, frente a los consumidores, las empresas destinatarias y los servicios de Inspección, que exigen niveles crecientes de calidad microbiológica. HACCP constituye un método sistemático y científicamente fundamentado para prevenir la presentación de problemas en relación con la seguridad e inocuidad de los alimentos. (Mouwen, 2009).

Legislación

El Departamento de Agricultura de los EE.UU. instauró un programa de vigilancia y de cero tolerancia para la *L. monocitogenes* en productos cárnicos listos para consumo y, más tarde, se extendió a sandwiches, ensaladas listas y productos de pesca.

Posteriormente, en el año de 1989, la FSIS (Servicios de Inspección y Seguridad de Alimentos), propuso también cerotolerancia de *L.monocytogenes* en productos similares como Hot-dog y lonches de carne, a la vez que condujo un programa de monitoreo en plantas para buscarla presencia de este patógeno. (Sánchez 2003).

El nivel de *L. monocytogenes* tolerado en los países es muy variable y va de tolerancia cero en 25 g en EE.UU. Hasta permitir la presencia de 100 UFC/g en algunos países de la Unión Europea.

En Mayo de 2004 numerosas asociaciones de industrias de los EE.UU. formularon una petición al Departamento de Alimentos y Medicamentos (FDA)

para que se eleve hasta 100 UFC/g la tolerancia de *L. monocytogenes* en alimentos que no permiten el desarrollo.

Numerosos investigadores, incluyendo la International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Proponen un valor objetivo de inocuidad alimentaria no mayor de 100 UFC/g al momento del consumo.

En países de la UE se establecen las siguientes categorías:

- 1 Alimentos LPC destinados a lactantes y alimentos LPC destinado a usos médicos especiales. En estos alimentos se fija ausencia en 25 g de alimento comercializados durante su periodo de duración mínimo ($n=10$, $c=0$). En este apartado tendremos que tener en cuenta que los productos que hayan recibido tratamiento térmico u otro proceso eficaz para eliminar *L.monocytogenes*, y cuando la re contaminación no es posible tras el tratamiento, no se exige realizar análisis regulares.
- 2 Alimentos LPC que pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, que no sean destinados a lactantes ni usos médicos especiales. En este caso se fijan unos límites de 100 ufc/g en productos comercializados durante su periodo de duración mínimo y ausencia en 25 g de alimento antes de que haya dejado el control inmediato del operador de la empresa alimentaria que lo ha producido ($n=5$, $c=0$, $m=100$ ufc/g, $M=100$ ufc/g).
- 3 Alimentos LPC que no pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, no destinados a lactantes ni a usos médicos especiales. Nos indica 100 ufc/g en productos comercializados durante su periodo de duración mínimo ($n=5$, $c=0$, $m=100$ ufc/g $M=100$ ufc/g). A esta categoría pertenecen los productos con $pH \leq 4$ o $a_w \leq 0,92$, productos con $pH \leq 5$ y $a_w \leq 0,94$, productos con una vida útil < 5 días, cualquier otro producto, siempre que se justifique científicamente.

Siendo: n , número de unidades de que se compone la muestra; c , número de unidades de la muestra cuyo número de bacterias podrá situarse entre m y M ; m , valor umbral del número de bacterias; M , valor límite del número de bacterias.

Otros países tiene una legislación mucho más exigente respecto a *L. monocytogenes*, como es el caso de EEUU, Japón, Canadá que establece tolerancia cero, para este microorganismo. (Marco, 2012).

En El Salvador de acuerdo al Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:08. Alimentos. Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos. Sección 8 Grupo de alimentos Carne y productos cárnicos. Subgrupo de alimentos. 8.2 Productos cárnicos cocidos y curados (embutidos). La tolerancia es ausencia en 25g. Y de acuerdo a la Norma Salvadoreña 67.02.13:98 Carnes y Productos Cárnicos Embutidos. Ausencia/g

Además El Ministerio de Salud y Asistencia Social (MINSAL). Tiene la responsabilidad de la aplicación de la *Norma Sanitaria para la Autorización y Control de Fábricas de Alimentos y Bebidas Procesadas, No. 001-2004-A*; la cual establece los requisitos sanitarios que deben cumplir los establecimientos alimentarios para la autorización de instalación y funcionamiento, además del permiso sanitario de los medios de transporte. A estas normas quedan sujetas todas las personas naturales o jurídicas que produzcan, fabriquen, almacenen, distribuyan o expendan alimentos procesados y los que se dediquen al transporte de los mismos.

A la vez, el MINSAL ha emitido la *Norma Sanitaria para la Autorización y Control de Fábricas de Embutidos y Productos Cárnicos Procesados en General, No. 003-2003*; la cual se aplica a los establecimientos dedicados a la fabricación, almacenaje y/o distribución de embutidos y productos cárnicos procesados en general, y contiene los requisitos mínimos de higiene en la

producción, manipulación, empaçado y almacenamiento de los mismos, con el fin de asegurar un suministro de tales productos cárnicos en condiciones higiénico-sanitarias. No se regulan en esta Norma las consideraciones higiénicas relativas a la matanza o sacrificio de los animales destinados al consumo humano.

Asimismo, al MINSAL le corresponde la aplicación de la *Ley y Reglamento de la Inspección Sanitaria de la Carne*, en conjunto con el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG); siendo que a este último le corresponde la inspección en mataderos y al MINSAL en establecimientos industriales de la carne y sus derivados y en los expendios al público consumidor. (Romano, 2012).

A pesar de los esfuerzos realizados a la fecha este microorganismo constituye aun un desafío que el hombre deberá vencer. (Mateada, 2013).

CAPITULO IV
METODOLOGÍA DE INVESTIGACION

IV METODOLOGÍA DE INVESTIGACION.

4.1 Metodología de campo

4.1.1 La primera etapa de la investigación consistió en hacer un diagnóstico de la planta procesadora de productos cárnicos donde se verificó el grado de cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura. (Cuadro N°4)

4.1.2 Se realizaron entrevistas al gerente y a los técnicos de producción de la planta de acuerdo a la lista de verificación

4.2 Recolección de Muestras.

4.2.1 Las muestras fueron recolectadas en la planta cárnica el día de su producción lo que se designó como tiempo cero (To). Ahí mismo se contaminaron artificialmente las salchichas inoculando en los extremos de la salchicha 1ml de dilución 10^{-6} equivalente a 100 UFC/mL (concentración estimada por recuentos en placa que fueron verificados previos a la inoculación) de *Listeria monocytogenes* ATCC 13932.

4.2.2 Luego de contaminar las salchichas una a una, se formaron los grupos de la siguiente manera: Para las de granel 10 grupos de salchichas de 3 unidades cada uno, se colocaron en bolsas estériles Whirl – pack de 6 oz. Las salchichas empacadas a vacío después de contaminarlas se colocaron de tres unidades por bolsa, luego se les aplicó el vacío, haciendo un total de 12 paquetes. Además se obtuvo una cantidad adicional de ambos productos para las determinaciones físicas de humedad y pH, y las que utilizarán como muestras blanco.

4.2.3 Se identificaron los paquetes con el nombre, fecha de producción, temperaturas y tiempos de almacenamiento. Se transportaron en hieleras, las de la condición de temperatura de 5°C con hielo y provistos de termómetro calibrado y las de temperatura ambiente sin hielo. Hasta el Laboratorio de Calidad Integral FUSADES, donde se almacenaron en

las condiciones establecidas. Los equipos en el Laboratorio tienen sus programas de mantenimiento y calibración para los instrumentos de medición de temperaturas, ya que se encuentra acreditado bajo la Norma ISO/IEC 17025.

4.2.4 Se realizaron las evaluaciones microbiológicas, y físicas correspondientes al tiempo cero. (El tiempo T0 comprende desde el momento de la contaminación más un tiempo aproximado de cuatro horas hasta la realización de las evaluaciones analíticas).

4.3 Metodología de Laboratorio

4.3.1 Preparación del inóculo de *Listeria monocytogenes*

4.3.1.1 Del material de referencia ATCC N°13932 de *Listeria monocytogenes* se tomó una asada y se suspendió en diluyente Butterfield's. A partir de esta primera dilución, se prepararon las demás tomando 10 mL agregando 90 mL de diluyente (Butterfield's) se agitó 5 veces con lo cual se obtendrá la dilución 10^{-1} , y así sucesivamente hasta llegar a la dilución 10^{-6} UFC/ mL. (Esta dilución fue cuantificada por siembra en esparcido en placas de agar Oxford y agar Cromo génico con anterioridad para poder obtener el recuento de 100 ufc/mL. Tabla N°35). Siendo esta última la que se utilizó para hacer la contaminación artificial a las salchichas. (Figura No.17).

4.3.2 Metodología analítica Microbiológica.

4.3.2.1 Se realizaron las determinaciones analíticas en los siguientes intervalos de tiempo, salchicha empacada a vacío y a granel en temperatura de almacenamiento de 25°C T0, T1, T2 y T4. Granel a temperatura de 5°C T0, T1, T2, T4, T8. Y vacío a temperatura de 5°C T0, T1, T2, T4, T8, T16 y T32 tomando en cuenta el vencimiento otorgado por el fabricante del producto que fue de 8

- días para granel refrigeración y 30 días para vacío a la misma temperatura. Haciendo un total de 60 análisis
- 4.3.2.2 Las determinaciones microbiológicas se realizaron con la metodología analítica del Bacteriological Analytical Manual (BAM), *on line*, chapter 10, 2011. (Figura N° 18)
- 4.3.2.3 Se pesó 50 gramos en balanza semi analítica en una bolsa estéril Seward 400.
- 4.3.2.4 Se agregó 450mL de caldo de enriquecimiento de listeria (BLEB), se homogenizó por 2 minutos en Homogenizador Stomacher Seward 400.
- 4.3.2.5 Se Incubó el enriquecimiento a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24y $48 \pm 2\text{h}$.
- 4.3.2.6 Se tomó 1mL del enriquecimiento y se esparció sobre la superficie de placas con medios de cultivo, tres de agar Cromo génico y tres de agar Oxford, se dejó a que el inóculo se secase, se incubó a $35 \pm 1^\circ\text{C} / 24\text{h}$.
- 4.3.2.5 Se utilizó en cada una de las verificaciones la suspensión de *Listeria monocytogenes* (dilución 10^{-6} equivalente a 100 UFC/mL de *Listeria monocytogenes*) como control positivo y como control negativo o blanco el producto natural que fue almacenado en las mismas condiciones que el contaminado.
- 4.3.2.6 Se hicieron los recuentos de las colonias desarrolladas que presentaron las características morfológicas de *Listeria monocytogenes*. (Tablas N°27, 28, 29 y 30)
- 4.3.2.7 Se realizó la identificación bioquímica por fermentación de azúcar, movilidad, CAM Test y API.

4.3.4 Determinaciones Físicas

4.3.4.1 Humedad en un Analizador Halógeno de Humedad.

4.3.4.1.1 Se pesó 1 g de muestra directamente en el equipo.

4.3.4.1.2 Se programó el equipo a temperatura de secado escalonado. Comenzando con 160°C/3min, luego 140°C hasta finalización de secado.

4.3.4.1.3 El equipo automáticamente provee el % de humedad.

4.3.4.1.4 Se registraron los resultados (Tabla N°31)

4.3.5 Determinación pH.

4.3.5.1 Se pesó 1g de muestra se agregó 100 mL de agua destilada.

4.3.5.2 Se homogenizó y se tomó la lectura de pH en un potenciómetro marca Orión, modelo 720 A.

4.3.5.3 Se registraron los resultados. (Tabla N°31).

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE
RESULTADOS

5.1 Resultados de Buenas Prácticas de Manufactura

Tabla No. 2 se presentó de forma global los resultados obtenidos de los aspectos evaluados en la comprobación del cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura.

Tabla No. 2 - Lista de verificación de los Aspectos Sanitarios Generales de los Establecimientos Alimentarios.

Aspectos Evaluados	Puntaje asignado	Puntaje obtenido
1. Ubicación y alrededores	2	1
2. Instalaciones Físicas	2	1
3. Pisos	2	2
4. Paredes y techos	4	3
5. Ventanas y puertas	3	3
6. Iluminación y ventilación	6	3
7. Cantidad y Calidad de agua	8	8
8. Sistema de Desagüe, manejo y disposición de deshechos	6	4
9. Desechos Sólidos	7	7
10. Instalaciones Sanitarias	6	5
11. Limpieza y Desinfección	9	7
12. Diseño de equipo y utensilios	9	4
13. Control de insectos y roedores	8	8
14. Higiene del personal, requisitos sanitarios	20	17
15. Conservación de las materias primas, empaques, manejo de sustancias Químicas y Registros Sanitarios	8	7
TOTAL PMA	100	
TOTAL SPO		80
TOTAL PN/A		0

Fuente: Norma Técnica-Sanitaria para la autorización y control de fábricas de alimentos y bebidas procesadas No-001-2004-A.Publicada en Diario Oficial Tomo N° 364 San Salvador, 6 de julio 2004

Se calculó el puntaje obtenido aplicando la siguiente fórmula:

Total de puntos obtenidos: 80 $80/100-0*100$

Donde SPO: suma puntos obtenidos

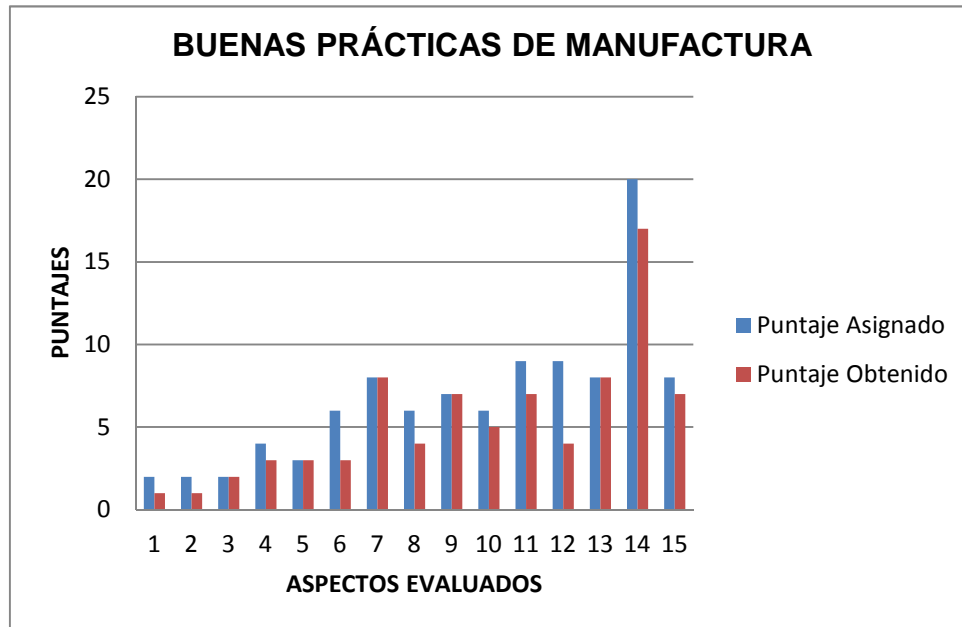
PMA: puntaje máximo asignado

PN/A: puntos que no aplican

$$\frac{SPO}{PMA-PN/A} \times 100$$

N/A: Cuando el aspecto a evaluar exigido por la norma no sea necesario (Escribir N/A en el interior de la casilla de la tabla de calificación.

Fig. N° 4 Lista de verificación de Buenas Prácticas de Manufactura.



La figura N°4 mostró los resultados obtenidos en la verificación de las buenas prácticas de manufactura de la empresa productora de las salchichas, se utilizó la lista de chequeo (cuadro N°4), Tomada de la Norma Técnica-Sanitaria para la autorización y control de fábricas de alimentos y bebidas procesadas No-001-2004-A. Publicada en Diario Oficial Tomo N° 364.

Los hallazgos encontrados son los siguientes: La empresa cuenta con registro sanitario como productora artesanal. Ya se tienen implementados los siguientes programas: De limpieza y sanitización, manejo de aguas residual, exterminio de insectos y roedores, materia prima de proveedores certificados, control de calidad de agua potable.

Áreas de producción y aseguramiento de calidad a cargo de profesionales el personal en general es frecuentemente capacitado en BPM y seguridad Industrial.

Existen fórmulas patrones de los diferentes productos, se lleva bitácora de producción donde se registran materias primas usadas por tipo de producto, cálculos para reflejar la productividad, lotes y fechas de vencimiento.

Se tiene establecido la vida útil de los productos, para el caso de salchichas empacadas a granel es de 8 días y para las empacadas a vacío de 30 días conservadas a temperatura de refrigeración.

No se efectúa verificación de la eficacia del proceso de limpieza y sanitización de los equipos, para autorizarlos y comenzar un nuevo lote de producción.

Los equipos en la distribución de la planta se encontraron en el orden adecuado de acuerdo a la función que desempeñan, pero no hay separación de áreas, (es decir área de producción, empaque, cocción y almacenamiento en cuarto frío). Por lo que se expone a contaminaciones cruzadas.

Se observaron paredes con partes deterioradas y algunas instalaciones eléctricas colgando del techo y otras improvisadas y sin protección.

El área de cocción se encontró que las paredes están construidas hasta la mitad y luego están con malla ciclón esto permite que ingrese polvo, roedores, otros animales e insectos que puedan contaminar el producto.

En el cuarto frío en el momento de la verificación se encontró almacenado producto terminado y materia prima (las canales de carne). Por lo que existe un alto riesgo de contaminación cruzada.

El proceso de cocción de las salchichas no se controla adecuadamente no hay verificación de la temperatura interna del producto que se está cocinando. Las

salchichas fueron colocadas en un recipiente de aluminio con agua hirviendo, donde se sumergen las salchichas y no hay control de uniformidad de temperatura, ni se verificó la temperatura interna del producto.

El proceso de enfriamiento se verifica en la misma área de cocción y consistió en sumergir las salchichas en un recipiente con agua con hielo y luego se colocaron en cestas (que estaban en el suelo), para almacenar en cuarto frío, esto expone al producto a contaminación post proceso.

Las bodegas de materia prima seca y material de empaque y embalaje además de ser pequeñas no garantizan que no se vaya a dar una contaminación cruzada o confusión de productos.

El área donde se lavan y sanitizan las cestas para almacenar y transportar el producto se encontró abierto con paredes a la mitad entonces se encuentra expuesta al polvo y a las plagas.

No se han establecido los puntos críticos de control en el flujograma de producción del proceso.

En la evaluación del efecto de empaque y temperatura de almacenamiento en la supervivencia de *L.monocytogenes* en salchichas, los resultados obtenidos Tablas N° 3,4,5,6. Fueron analizados evaluando primero efecto de temperatura y segundo efecto de empaque.

En el primer caso para evidenciar el efecto de temperatura de almacenamiento se mantuvo constante el empaque es decir para un mismo empaque cual fue la influencia de utilizar dos temperaturas de almacenamiento. (Figura N° 5 y 6); y en el segundo caso se evaluó el efecto de empaque para ello se mantuvo constante la temperatura. (Figuras N° 7 y 8).

5.2.1 Efecto de la Temperatura sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en empaque vacío y granel.

Tabla N°3 Evaluación del efecto de la Temperatura en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en empaque al vacío

Tiempo/Días	UFC / g		Log UFC / g	
	T: 5°C	T: 25°C	T: 5°C	T: 25°C
0	85	142	1.93	2.15
1	198	229	2.30	2.36
2	337	525	2.53	2.72
4	550	737	2.74	2.87

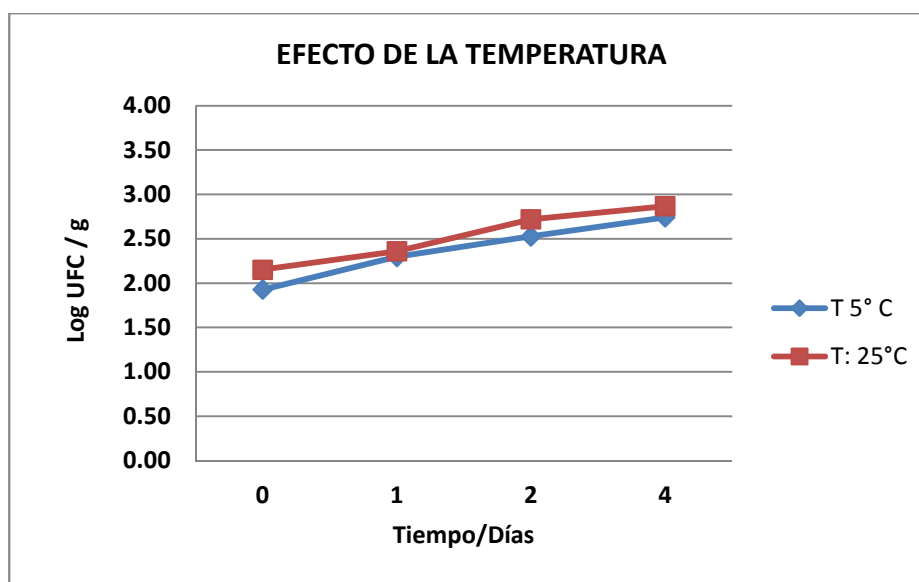


Fig. N°5. Crecimiento de *Listeria monocytogenes* empaque al vacío

La figura N°5 demostró que las dos temperaturas de almacenamiento permitieron el crecimiento de *Listeria monocytogenes* aún que se encontró empackada a vacío. En el caso de temperatura de 25°C alcanzó concentraciones mayores en UFC/g.

Tabla N°4 Evaluación del efecto de la Temperatura en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en empaque a granel.

Tiempo/Días	UFC / g		Log UFC / g	
	T: 5°C	T: 25°C	T: 5°C	T: 25°C
0	296	796	2.47	2.90
1	618	1206	2.79	3.08
2	639	1475	2.81	3.17
4	819	2085	2.91	3.32

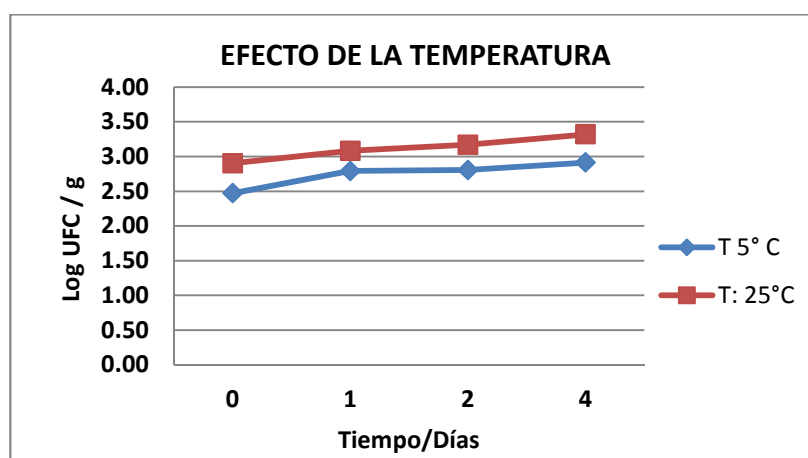


Fig. N° 6 Crecimiento de *Listeria monocytogenes* empaque a granel

En la figura N° 6 se observó cual fue el efecto de temperatura en la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en salchicha empacada a granel, Obteniéndose que la bacteria sobrevivió a las dos temperaturas de almacenamiento.

Comparando las figuras 5 y 6 se demostró que por efecto de temperatura la supervivencia y crecimiento de *Listeria monocytogenes* alcanzó valores en UCF/g mayores a temperatura de 25°C para los dos empaques.

5.2.2 Evaluación del efecto del empaque sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* a temperatura de 5°C y 25° C.

Tabla N°5 Crecimiento de *Listeria monocytogenes* evaluando efecto de empaque a temperatura de 5°C

Tiempo/Días	UFC / g		Log UFC/ g	
	Vacío	Granel	Vacío	Granel
0	85	296	1.93	2.47
1	198	618	2.30	2.79
2	337	639	2.53	2.81
4	550	819	2.74	2.91

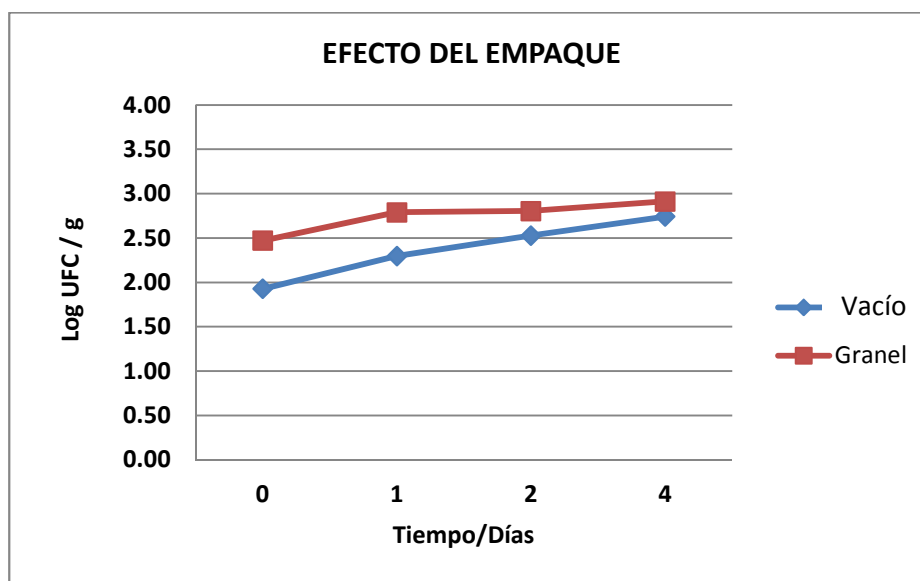


Fig. N°7 Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en temperatura de 5°C

En la figura N° 7 mostró el efecto del empaque observándose que en ambos empaques *Listeria monocytogenes* demostró crecimiento en temperatura de refrigeración de 5°C. Siendo los valores de UFC/g mayor para el empaque a granel.

Tabla N°6 Crecimiento de *Listeria monocytogenes* evaluando efecto de empaque a Temperatura 25°C

Tiempo/Días	UFC / g		Log UFC/g	
	Vacío	Granel	Vacío	Granel
0	142	797	2.15	2.90
1	230	1206	2.36	3.08
2	525	1475	2.72	3.17
4	738	2085	2.87	3.32

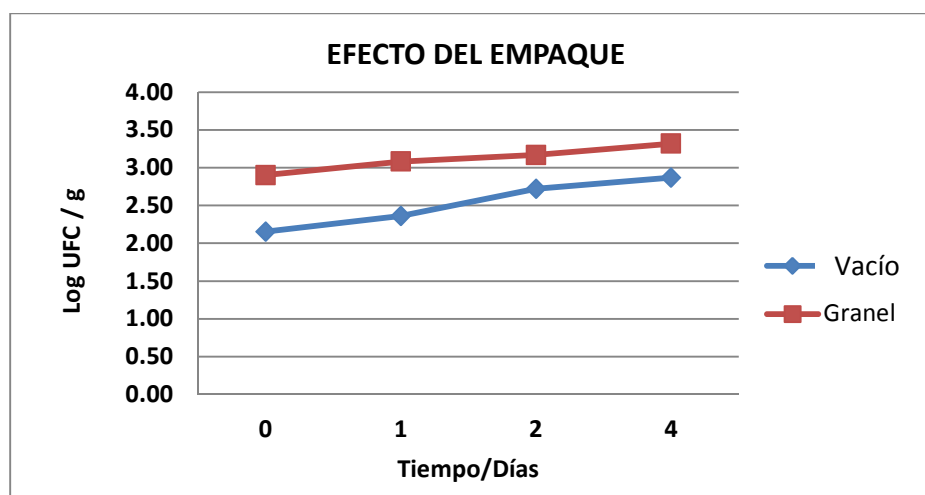


Fig. N°8 Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en temperatura de 25°C

En la figura N° 8 se observó que el comportamiento del crecimiento de *Listeria monocytogenes* por efecto de empaque a temperatura de 25°C, los dos empaques permitieron crecimiento. Al comparar el comportamiento manifestado por la bacteria figuras 7 y 8, por efecto de empaque, se observó que en las dos temperaturas (5°C y 25°C) el número de UFC/g fueron mayores en las salchichas empacadas a granel.

5.2.3 Relación del crecimiento *Listeria monocytogenes* y el tiempo de almacenamiento de las salchichas en las dos temperaturas y empaques.

Formula general en el modelo racional que predice la cantidad de UFC/gr en Días: $Y = a + b(x) / 1 + c(x) + d(x^2)$ donde Y es UFC/g y x es igual a cada tiempo en días
 $UFC/g = 8.5715 + (7.9817)(16) / (1 + (-1.8946)(16) + (3.5333)(16^2))$

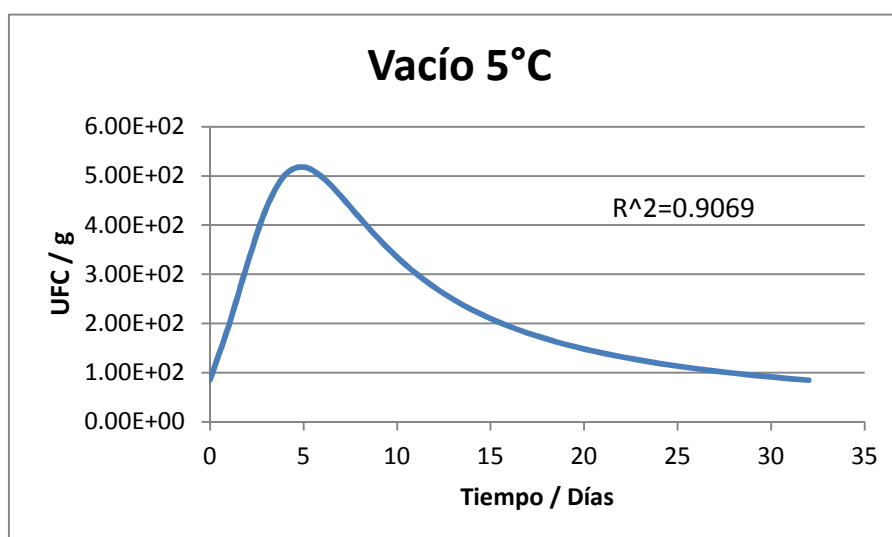


Fig. N°9 – Crecimiento en vacío a 5°C

En la figura N°9 se demostró que *Listeria monocytogenes* experimentó sobrevivencia durante los 32 días de almacenamiento en condiciones de 5°C y empaque a vacío. Evidenció que en los primeros cinco días es donde se obtuvo el máximo valor de UFC/g a partir de este comenzó a decrecer. El modelo indicó que bajo las condiciones de almacenamiento de 5°C y empaque a vacío *Listeria monocytogenes*, permanece viable durante el período de vida útil del producto que para el caso de las salchichas utilizadas en la investigación es de 30 días. Además se observó que presentó el máximo crecimiento a los cinco días. Este comportamiento indicó el grave riesgo de consumir el producto dentro de la vigencia de su vida útil y estar la bacteria en concentraciones peligrosas.

La siguiente figura mostró el comportamiento de la bacteria en empaque a vacío pero a la temperatura de almacenamiento ambiente de 25°C.

Formula general en el modelo racional que predice la cantidad de UFC/gr en Días: $Y = a + \frac{b(x)}{1+c(x)+d(x^2)}$ donde Y es UFC/g y x es igual a cada tiempo en días $UFC/g = 1.42 + \frac{-2.9980(4)}{1 + (-6.0121)(4) + (8.9675(4^2))}$

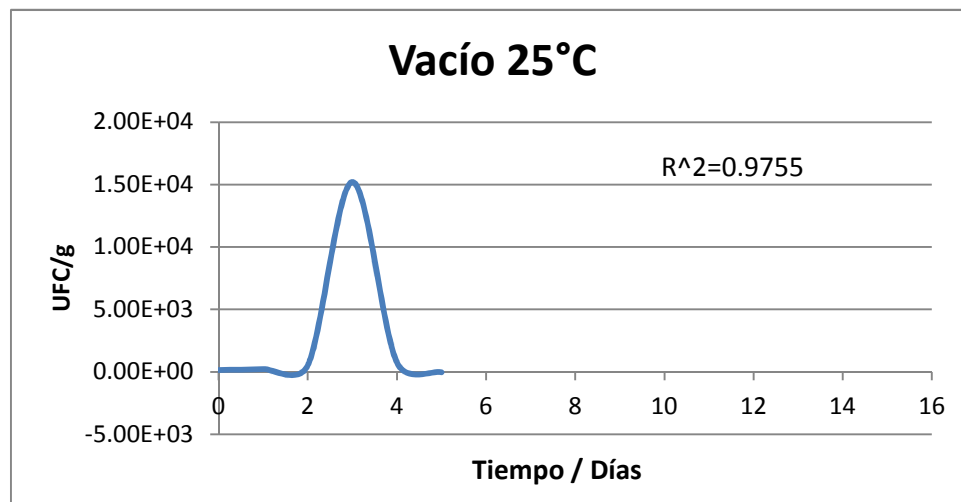


Fig. N°10 – Crecimiento en vacío a 25°C

La figura N°10 Demostró que el máximo de crecimiento se obtuvo a los tres días. Pero bajo estas condiciones ya existió evidencia de aspectos sensoriales anormales de color, olor y textura. Por lo que se asume el producto no será consumido.

Comparando las figuras 9 y 10 se observó que el comportamiento de la bacteria en salchichas en condiciones de empaque a vacío pero bajo la influencia de temperatura la supervivencia y crecimiento en ufc/g es mayor a 25°C. A pesar que el crecimiento es mayor el más grande riesgo lo constituye las almacenadas a 5°C debido a que el producto mantiene sus características sensoriales aceptables no hay evidencia visible del crecimiento de la bacteria y el producto puede ser consumido.

El comportamiento de crecimiento de la bacteria a granel se mostro en la siguiente figura No.11

Formula general en el modelo racional que predice la cantidad de UFC/gr en Días: $Y = a + b(x)/1 + c(x) + d(x^2)$ donde Y es UFC/g y x es igual a cada tiempo en días.
 $UFC/g = 2.96010 + (1.02375)(8) / (1 + (1.75165)(8) + (-1.22596)(8^2))$

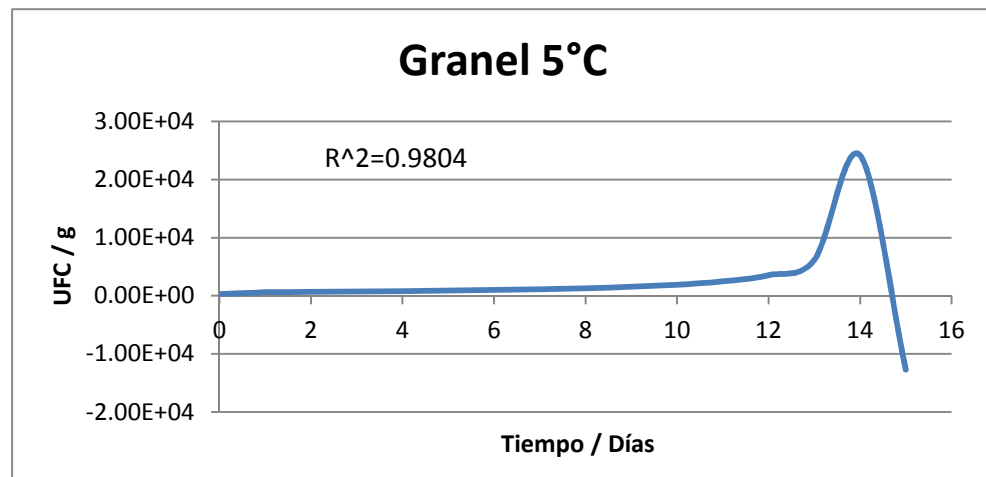


Fig. N° 11 Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en empaque a granel

La figura N°11 el modelo indicó que por efecto de temperatura de refrigeración y empaque a granel, la bacteria mantuvo la supervivencia por un período de 12 días con incrementos mínimos en los valores de ufc/g, pero a partir del día 13 comienza a aumentar experimentando el valor máximo a los 14 días y luego decae.

Este comportamiento sugirió que podemos almacenar en refrigeración la salchicha y durante doce días esta puede mantener sus características de color, olor y textura apropiadas, es decir sin un signo que pueda indicarnos que el producto no debería ser consumido.

El comportamiento de la *Listeria monocytogenes* en empaque a granel pero a temperatura ambiental de 25°C

Formula general en el modelo racional que predice la cantidad de UFC/gr en Días: $Y = a + b(x)/1 + c(x) + d(x^2)$ donde Y es UFC/g y x es igual a cada tiempo en días
 UFC/g = $7.9650 + (-1.6024)(4) / (1 + (-1.4659)(4) + 1.74973(4^2))$

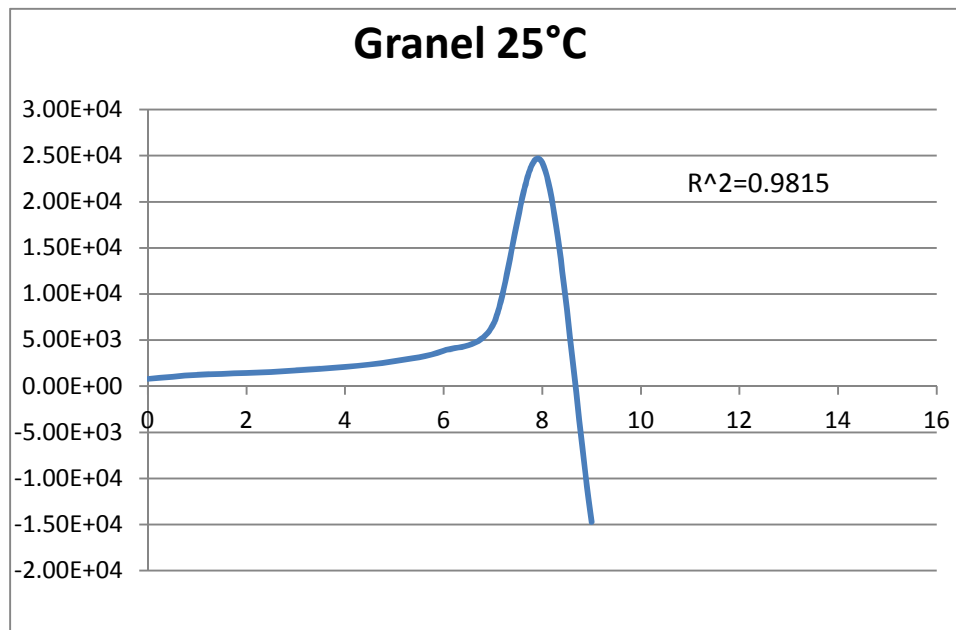


Fig. N°12 – Crecimiento a granel a 25°C

En la figura N°12 se observó que las salchichas en condiciones de granel a 25°C, el aumento en las ufc/g comenzó a los 6 días y el máximo se obtuvo a los ocho días. Poniendo de manifiesto al comparar las figuras 11 y 12 que la influencia de la temperatura ambiental aceleró el crecimiento. Ya que en temperatura de 5°C el valor más grande de UFC/g se alcanzó a los doce días y en 25°C a los ocho días.

5.2.4 Verificación de los cambios de humedad en los diferentes tiempos y condiciones de almacenamiento.

Tabla N°7 Resultados de humedad a Granel

Tiempo	Granel 25°C	Granel 5°C
T0	67.52	68.04
T1	67.30	66.79
T2	68.38	67.23
T4	69.04	68.13
T8		70.68

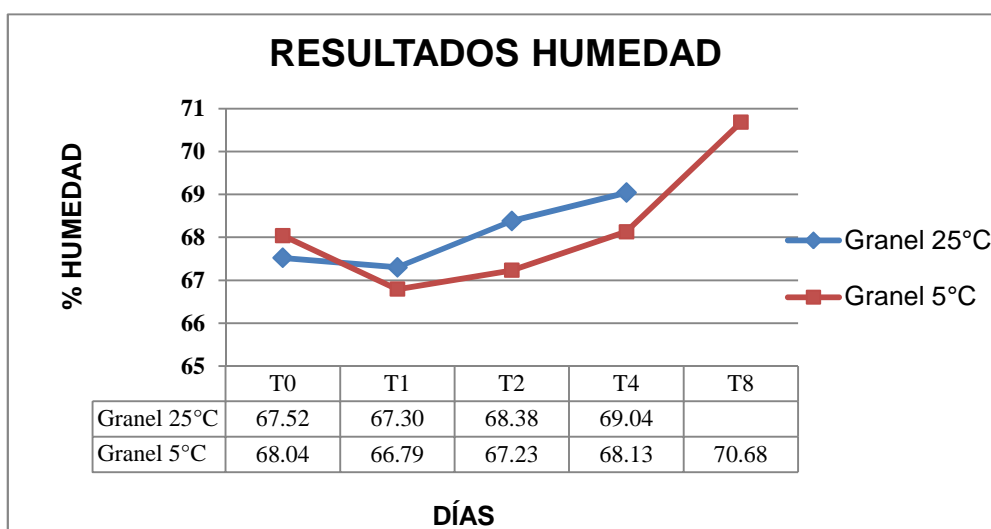


Fig. N°13 - Humedad en Salchicha empacada a granel

La figura N°13 demostraron los cambios efectuados en el porcentaje de humedad en las salchichas a granel durante los días de almacenamiento, observándose que para las dos temperaturas, en el tiempo T1 existió disminución en el % de humedad. Luego a partir del tiempo de almacenamiento del T2,T4,T8 el % humedad aumentó probablemente el empaque a granel permitió ingreso de humedad ambiental.

Tabla N°8 Resultados de humedad a Vacío

Tiempo	Vacío 25°C	Vacío 5°C
T0	69.40	68.74
T1	68.55	68.53
T2	67.95	68.07
T4	66.33	67.47
T8		66.15
T16		65.54
T32		65.05

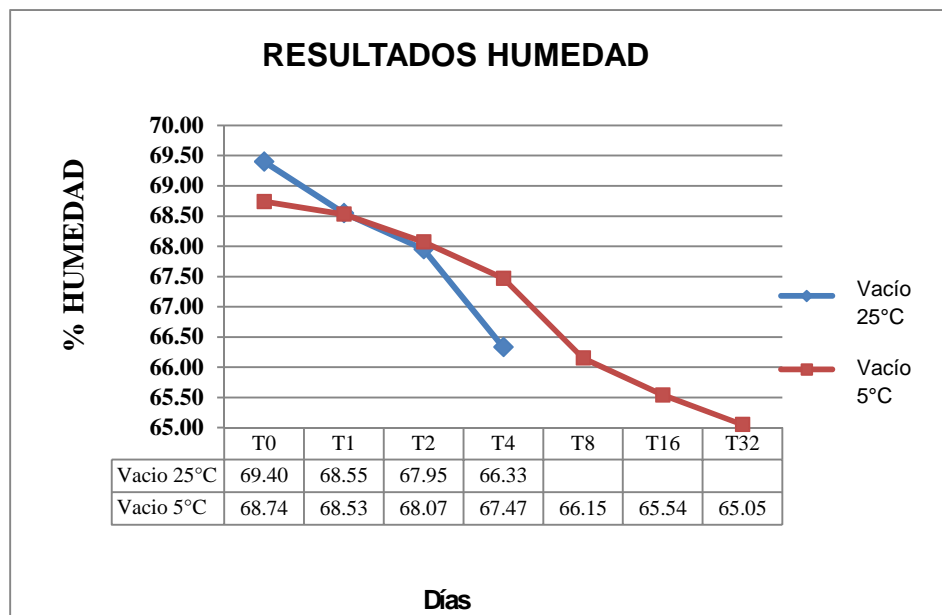


Fig. N° 14 Humedad empacada a vacío

En la figura N°14 se observó que el % de humedad disminuyó en las dos temperaturas de almacenamiento. Siendo los valores del tiempo T1 y tiempo T2 similares, luego en el tiempo T4 en temperatura de 25°C se pierde humedad más rápidamente en comparación con la de temperatura de 5°C cuya pérdida de humedad se dio en forma gradual.

5.2.5 Verificación de los de pH en los diferentes tiempos y condiciones de almacenamiento.

Tabla N° 9 Resultados de pH en empaque a vacío

Tiempo	Vacío 25°C	Vacío 5°C
	pH	pH
T0	6.58	6.87
T1	6.59	6.82
T2	6.11	6.83
T4	5.21	6.79
T8		4.99
T16		4.88
T32		4.75

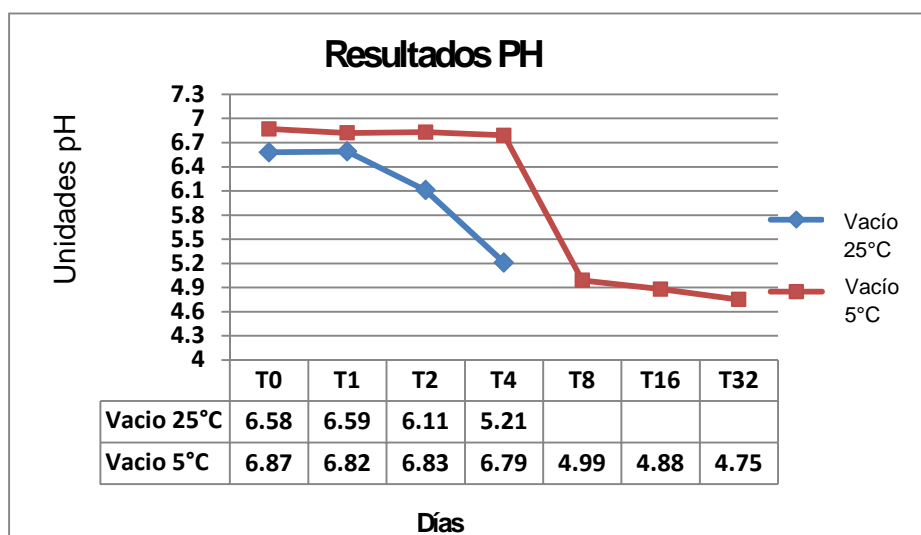


Fig. N°15 - pH empacada a vacío

La figura N°15 demostró que en empaque a vacío los valores de pH disminuyeron, en las dos temperaturas de almacenamiento. Es de hacer notar que a temperatura de almacenamiento de 5°C en los primeros cuatro días se mantuvieron constantes los valores de pH, y a partir del tiempo T4 experimentaron la caída mayor y en los restantes tiempos volvió a comportarse como al inicio. En cambio para la temperatura de 25°C solamente en las primeras 24 horas de almacenamiento se observó valores constantes y luego ya experimentó el decaimiento en los valores de pH.

Tabla N° 10 Resultados de pH en empaque a granel

Tiempo	Granel 25°C	Granel 5°C
	PH	pH
T0	6.63	6.69
T1	5.93	6.47
T2	5.4	6.80
T4	5.10	6.57
T8		4.55
T16		
T32		

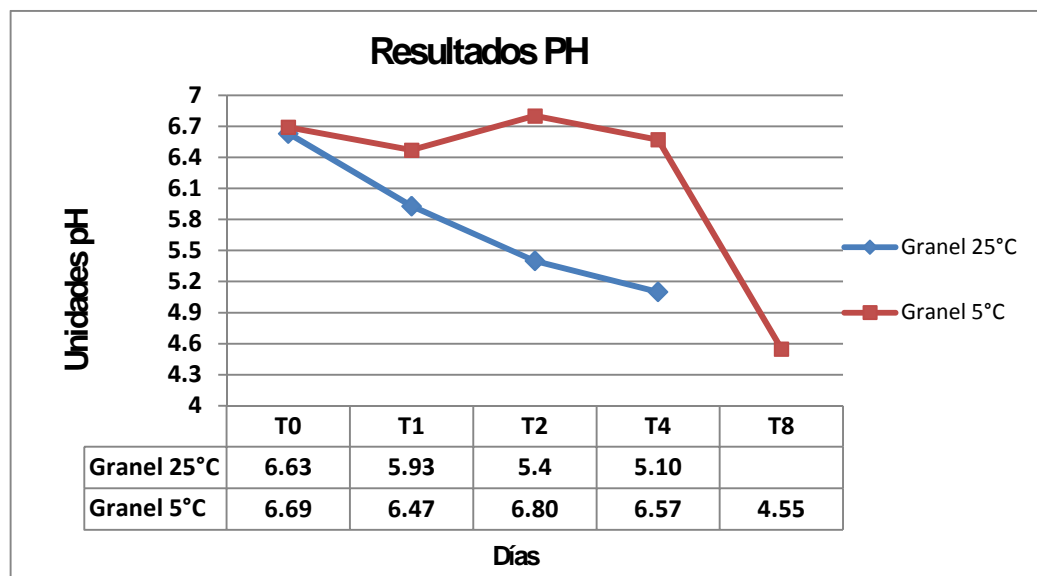


Fig. N°16 - pH en empaque a granel

La figura N°16 Se observó que para las salchichas a granel en las dos temperaturas de almacenamiento los valores de pH disminuyeron, obteniéndose que para la temperatura de 25°C los valores son más bajos que para la de 5°C. ya que a los 5°C mantuvo valores similares en los primeros cuatro días de almacenamiento y es hasta el tiempo ocho que se observó la disminución mayor.

Análisis estadístico

El procesamiento de la información de los resultados analíticos, se realizó mediante el paquete estadístico SPSS para Windows v10 para cada tiempo de almacenamiento T0, T1, T2, T4. Los factores fueron empaque a vacío y a granel y temperatura de almacenamiento de 5°C y 25°C. El análisis de varianza (ANOVA) determinó que existieron diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza de 95 %, en los grupos durante los días de almacenamiento. Tablas N° (T0) 11,12, 13, (T1) 15, 16, 17, (T2) 19, 20, 21, (T4) 23, 24 y 25.

Como los valores de supervivencia de *Listeria monocytogenes* en los diferentes grupos evidenciaron diferencia entre ellos, se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, para establecer entre cuales tratamientos existió diferencia significativa, luego se realizaron pruebas de comparaciones que mide la diferencia de los valores de las medias de grupos en términos de varianzas intergrupales. Tablas N° (T0) 14, (T1) 18, (T2) 22 y (T4) 26.

Encontrándose que, para el tiempo T0, existió diferencia significativa entre las medias de los subconjunto vacío de 5°C, vacío de 25°C, granel de 5°C y granel de 25°C(Tabla N° 14). Esto pudo deberse a que el T0 incluyó un período aproximado de cuatro horas desde el momento de la inoculación hasta la realización de las determinaciones analíticas correspondiente a este tiempo,

Para el tiempo T1 los subconjuntos vacío a 25 y vacío de 5°C son iguales y para la condición de granel diferente (Tabla N° 18) comprobándose que el empaque a vacío permitió el crecimiento de la bacteria independientemente de la temperatura.

En el tiempo T2 se demostró diferencia significativa entre los cuatro subconjuntos (Tabla N° 22)

Los subconjuntos en el tiempo T4 demostraron que el empaque vacío de 25°C y Granel de 5°C no existió diferencia en estos subconjuntos, mientras que para vacío de 5°C y Granel de 25°C si hubo diferencia.

En este caso lo que se evidenció que el tiempo de almacenamiento permitió que las salchichas empacadas a vacío desarrollara un crecimiento tan grande como el manifestado en las salchichas empacadas a granel y que la temperatura de refrigeración de 5°C es un factor favorable para el crecimiento de *L.monocytogenes*.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

VI CONCLUSIONES

1. En la planta productora de salchichas los programas pre-requisito de limpieza, desinfección y saneamiento, están documentados pero requieren implementar los controles que validen dichos procesos. Esto explicaría por qué, el porcentaje de cumplimiento en aspectos como condiciones del área de elaboración, equipos y utensilios, requisitos higiénicos de fabricación no se cumple en su totalidad.
2. Del puntaje máximo asignados en los 15 ítems que la norma establece para el buen funcionamiento de estas fábricas. Solamente se alcanzó el 80% de cumplimiento, lo que indicó que la empresa se encontró en el mínimo exigido para el funcionamiento. Esto permite acciones de mejoras para llegar a obtener el 100% esperado.
3. El empaque a vacío no constituyó una barrera suficiente para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Desde el punto de vista de salud pública este comportamiento es muy preocupante, porque el uso de empaques a vacío sirve para establecer un período más largo de vida útil que un producto empacado a granel. Y esto puede permitir que la bacteria alcance concentraciones riesgosas.
4. Las temperaturas de refrigeración son favorables para el crecimiento de *Listeria monocytogenes* durante el almacenamiento, por lo tanto si los productos cárnicos, como las salchichas, no son elaborados bajo buenas prácticas se aumenta el riesgo que la bacteria se multiplique si ésta se encuentra presente en el alimento.

5. Al evaluar el efecto de empaque y temperatura de almacenamiento en el comportamiento de la supervivencia y crecimiento de *Listeria monocytogenes* el crecimiento fue mayor en condiciones de desafío como la de 25°C y empaque a granel, en cambio a temperatura de refrigeración y empaque a vacío el desarrollo de la bacteria se limita.
6. *Listeria monocytogenes* es susceptible al calor por lo tanto es fácil eliminarla por medio de procesos térmicos, sin embargo la principal preocupación debe ser el control de la temperatura de cocción y el garantizar que se alcance esta temperatura en el centro de las salchicha.
7. El almacenamiento a temperaturas de refrigeración y empaque a vacío no representaron condiciones que evitaron el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Razón por la cual es necesario garantizar desde origen el control del patógeno y luego en todo el proceso de producción y distribución. Por lo que es importante la implementación del sistema de control de puntos críticos de control (HACCP).
8. La temperatura de 25°C influyó de manera significativa el crecimiento de la bacteria. Ya que al comparar el comportamiento de *Listeria monocytogenes* en el mismo empaque pero a las dos temperaturas de 5°C y 25°C el crecimiento a temperatura ambiente es mayor. Por lo que estos productos no deben mantenerse a temperatura ambiente por períodos prolongados.
9. El mayor riesgo se puede encontrar en refrigeradores de hogar donde no se puede controlar adecuadamente la temperatura y la forma de almacenar productos. Esto generalmente propicia contaminaciones cruzadas. Además las salchichas pueden no ser consumidas todas de una sola vez y guardar el remanente para consumo posterior con esto

estaríamos contaminando otros alimentos que se almacenen en refrigeración.

- 10 La disminución en los valores de pH pudo haberse debido a la proliferación de la flora acompañante en los productos cárnicos, ya que los valores más bajos se obtuvieron en el caso de la salchicha empacada a vacío y en temperaturas de refrigeración (5°C) es decir en el período más largo de almacenamiento. El envasado al vacío, al eliminar el oxígeno, favorece el crecimiento de levaduras anaerobias facultativas y de bacterias ácido lácticas hetero fermentativas.
- 11 El aumento en el porcentaje de humedad de la salchicha empacada a granel se relacionó con humedad ambiental; en cambio la empacada al vacío probablemente su disminución fue debida a que el empaque sirvió de barrera que no permitió obtener humedad ambiental.
- 12 En el análisis estadístico se demostró que la temperatura de refrigeración y el empaque a vacío permitió el crecimiento de la bacteria, comprobándose la hipótesis alterna es decir que el empaque a vacío y temperatura de almacenamiento de 5°C no inhiben el crecimiento de *L. monocytogenes*.

CAPITULO VII RECOMENDACIONES

VII RECOMENDACIONES

- 1 Continuar con la implementación del manual de la buenas prácticas de manufactura y la validación de los programas prerrequisitos SOP's y SSOP's que son la base para el establecimiento del sistema de análisis de riesgos y control de los puntos críticos (HACCP).
- 2 Establecer dentro del proceso de producción de salchichas tipo Hot-Dog de la planta artesanal los siguientes puntos críticos de control: PCC 1 Temperatura de cocción por ser este el único tratamiento térmico que garantiza la eliminación del patógeno. PCC 2: En área de producción se requiere detector de metales, para controlar el peligro físico debido a la posibilidad de hallar fragmentos o partículas metálicas al interior de las salchichas. PCC 3 Separación de áreas de almacenamiento en cuarto frío para evitar el riesgo de contaminación cruzada de producto terminado con productos crudos.
- 3 Cerrar completamente las áreas de lavado de cesta y de cocción eliminando la malla ciclón para evitar el ingreso de plagas. Subsanan las paredes que se encontraron deterioradas por la humedad.
- 4 Colocar extractores de humo en el área de cocimiento y ahumado.
- 5 Mantener control de la temperatura de refrigeración para productos perecederos en toda la cadena, es decir, desde su producción, almacenamiento, distribución, comercio de venta al por mayor o menor y consumidores de forma constante.
- 6 Cuidar de no mantener las salchichas "Hot dog" a temperatura ambiente.

- 7 Considerar que el empaque a vacío es una buena opción para lograr la vida útil en productos cárnicos, pero requiere que los contaminantes microbiológicos y especialmente patógenos sean controlados desde el origen.
- 8 Utilizar además de empaque a vacío el concepto de barreras su inhibitorias para el crecimiento microbiano como bajos pH, aw, o una corta vida útil, junto con una constante supervisión de la temperatura del producto, el concepto de obstáculos ofrecen una barrera completa al crecimiento y es necesaria para garantizar la seguridad de los alimentos.
- 9 Enfatizar la importancia que la industria cárnica implemente sistemas de análisis de peligros y control de puntos críticos como la herramienta que contribuyen al aseguramiento de la calidad en la producción de alimentos para que sean seguros, saludables e inocuos.
- 10 Al consumidor lo que indica la USDA que al comprar salchichas para “Hot dog,” llevarlas directamente de la tienda al hogar y refrigerarlas o congelarlas inmediatamente. Si la etiqueta no lleva fecha, el producto se puede refrigerar por dos semanas si el paquete está cerrado, o una semana si el paquete está abierto. Para la mejor calidad, congele las salchichas “Hot dog” por no más de uno o dos meses.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Altolaquirre Bernacer, J.I., *et al.* (2008). *Guía de ayuda para el autocontrol en las pequeñas industrias cárnicas*. Gobierno del Principado de Asturias. Consejería de Salud y Servicios Sanitarios.
2. AESAN. (2011). *Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los estudios de vida útil para Listeria monocytogenes en determinados productos alimenticios*. Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 18 de mayo de 2011.
3. Alvarado Reséndiz, M.G. (2006). “Efecto de la adición de los derivados de *Lupinus spp* (aislado, harina y concentrado proteico) sobre las características de textura de salchichas”. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
4. Arce Álvarez, C.V, Flores Flores, E.D, Martínez Salguero, K.E. (2010). “*Diseño de un modelo de planeación y control para el fortalecimiento de la administración de los recursos financieros en las pequeñas empresas dedicadas a la fabricación y comercialización de embutidos en el área metropolitana de San Salvador*”. Universidad de El Salvador.
5. Armenta, A.F. (2006). *Elaboración y evaluación de vida de anaquel de salchichas tipo Frankfurters a partir de músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*)*, Tesis profesional. Los Monchís, Sinaloa, México.
6. Avalos Álvarez, C.L.; Cruz Pineda, A.V.; Cañas Rivas, F.A. (2003), *Diseño de un programa de Trade Marketing Retail para mejorar el funcionamiento*

de los canales de distribución de las grandes empresas salvadoreñas dedicadas a la comercialización de embutidos en el área metropolitana de San Salvador. Consultado el 3 de marzo de 2014. Página web:<http://www.wisis.ufg.edu.sv/www.wisis/documentos/TE/664.902-438d/664.902-P438d-Capitulo%20I.pdf>

- 7 Ávila Valverde, M.L. (2007). *Diseño de la documentación del sistema de buenas prácticas de manufactura para la empresa Le Chandellier*. San José Costa Rica.
- 8 Bedie, G.K, et al. (2001). "Antimicrobials in the formulation to control *Listeria monocytogenes* post processing contamination on Frankfurters stored at 4°C in vacuum packages", *J. of Food Protection*, vol. 64, n. 12.
- 9 Benlloch Giménez, A. (2011). *Guía para la Elaboración de programas de control de Listeria monocytogenes en la industria cárnica*.
- 10 Betelgeux. (2013). Estratégias de control de *listeria monocytogenes* persistente. Consultado el 10 de enero de 2014. Servicios técnicos del sector agroalimentario. Valencia 2013. Página web: <http://www.betelgeux.es>.
- 11 Bille, J. (1990). *Epidemiology of human Listeriosis in Europe, with special reference to the swiss out break*. En Miller A.J, Smith, J.L.&Somkuti, G.A (eds). *Food borne Listeriosis*. Amsterdam's, Elsevier. Pag.71-74.
- 12 Buncié, S. (1991). *The Incidence of Listeria monocytogenes in Slaughtered Animals, in Meat, and in Meat Products in Yugoslavia*. *International Journal of Food Microbiology*.173-180.

- 13 Calderón, G.R. (2001). *Informe de la situación de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) en El Salvador*. Fortalecimiento de los comités del CODEX y Aplicación de las normas del Codex Alimentarius. Proyecto TCP/RLA /0065 FAO/CONACYT. San Salvador.
- 14 Callejo, R., et al. (2008). *Manual de Procedimientos Aislamiento, Identificación y Caracterización de Listeria monocytogenes*.
- 15 Carto Mejía, J. (2007). *Predicción de las características Físicas y Sensoriales de una salchicha basada en la temperatura final de la emulsión*. Zamorano. Honduras.
- 16 Cayre, M. E. et al, (n.d.) *Población Microbiana Asociadas con Salchichas Tipo Viena*. Argentina.
- 17 CIDRAP. (2004). [Internet] Universidad de Minesota, Minneapolis 2008. [citado 11 abril 2014]. Consultada el 18 de junio de 2014. Página web: <http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/>
- 18 CODEX. Comisión del Codex Alimentarius. FAO/OMS. (2003). *Código Internacional de prácticas recomendado – principios generales de higiene de los alimentos*. CAC/RCP 1-1969 rev 4.
- 19 CONACYT. (1998). NSO.02.13:98. *Norma Salvadoreña Obligatoria. Carne y productos cárnicos embutidos*.
- 20 CONAMYPE. (2008). *Cap I, Aspectos Generales y antecedentes sobre las medianas empresa comercializadoras de productos de embutidos ubicados en el área metropolitana de San Salvador*. Consultado el 14 de noviembre de 2013. Página web:

<http://www.wisis.ufg.edu.sv/www.wisis/documentos/TE/664.902-438d/664.902-P438d-Capitulo%20I.pdf>

- 21 Cutter C.N., Henning W.R. (2003). *Control de Listeria monocytogenes en pequeñas plantas procesadoras de carnes y aves*. The Pennsylvania State University.
- 22 Demuner Carreón V., Guzmán I. (2004). Envases, empaques y embalajes alimentarios, revista de divulgación científica y tecnológica Universidad Veracruzana, Vol. XXII.
- 23 Díez Maté A.M., Jaime Moreno I., Rovira J. (2009). *Nuevas tecnologías en la conservación y transformación de los alimentos*. Cap 1. Pág. 45-59. Universidad de Burgos.
- 24 Domínguez Carmona M. (n.d.) *Listeriosis una zoonosis emergente de transmisión alimentaria*. Universidad de San Pablo. España.
- 25 Dube Pérez D., Andujar Robles G. (2000). *Cambios de coloración de los productos cárnicos*, *Rev. Cubana Aliment Nutr*; 14 (2): 114-23, Instituto de Investigaciones para la industria Alimenticia.
- 26 FAO/OMS. (2003). Comisión del Codex Alimentarius. *Código Internacional de prácticas recomendadas- principios generales de higiene de los alimentos CAC/RCP 1-1969 rev4 2003*.
- 27 FAO/OMS. (2004). *Evaluación de Riesgos de Listeria monocytogenes en Alimentos Listos para el consumo*.
- 28 Farber J.M. and Peterkin P.I. (1991). *Journal Listeria monocytogenes, a Food-borne Pathogen*.

- 29 Fernández R. A., *et al.* (2004). *Efecto del tiempo y la temperatura de Almacenamiento sobre la Calidad Microbiológica de Carne de Hamburguesa*. Unidad de Investigación Ciencia y Tecnología Universidad del Zulia Maracaibo Venezuela.
- 30 Figera E.B., *et al.* (2005). *Crecimiento de Listeria monocytogenes en atún ahumado empacado al vacío*.
- 31 Foods and Drugs Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM). (2003). *Detection and Enumeration of Listeria monocytogenes in foods*. Online chapter 10.
- 32 FSIS. (2003). Risk Assessment for *Listeria monocytogenes* in Deli Meats. Consultado el 18 de mayo de 2014. Página web:
http://www.fsis.usda.gov/PDF/Lm_Deli_Risk_Assess_Final_2003.pdf.
- 33 García López M.L. (n.d.). *Tecnologías de envasado en atmósferas protectoras y su calidad microbiológica*. Departamento de Higiene y tecnología de Alimentos, Facultad Veterinaria Universidad de León.
- 34 González Zorn B., Suárez Rodríguez M. (s.d.). *Listeria y Listeriosis*. *Revista Seguridad Alimentaria*. Universidad Complutense de Madrid.
- 35 H Rivera F., *et al.* (2006). Determinación Microbiológica y Molecular de *Listeria sp* y *Listeria monocytogenes* en cerdas a nivel de una planta beneficiadora en EUA. *Revista Científica* Vol XVI, N° 3. 2006. Consultada el 12 junio de 2014. Página web:
<http://www.wisis.ufg.edu.sv/www.wisis/documentos/TE/664.902-945d/664.902-A945d-CAPITULO%20I.pdf>

- 36 ICMSF. (2006). *Directrices de cumplimiento para el control de la Listeria monocytogenes en los productos RTE (listos para comer) de carne de aves de corral con exposición post-letal.*
- 37 Jensen S.J. (2006). *Protección de la Calidad de Carnes Rebanadas. Monografía.*
- 38 Kopper G. Calderón G., et al. (2009). *Estudios de Casos en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO.*
- 39 López V. et al. (2006). *Listeria monocytogenes. ¿Son todos los aislamientos igual de virulentos?.* Revista Argentina de Microbiología Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- 40 Marco Ruesca N. (2012). *Listeria monocytogenes en productos cárnicos. Resistencia a los antibióticos.* Curso impartido 2011-2012. Universidad de Zaragoza. España.
- 41 Marcos B., Jofré A., Aymerich T., Monfort J. M., Garriga M. (2008). *“Combined effect of natural antimicrobials and high pressure processing, to prevent Listeria monocytogenes growth after cold chain break, during storage of cooked ham”, Food Control.*
- 42 Martí Trepas i Quílez. (2002). *Incidencia y comportamiento de Salmonella y Listeria en pechugas de pavo curadas.* Universidad Autónoma de Barcelona. España.
- 43 Martín Juárez B. (2005). *Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares.* Estandarización, seguridad y mejora tecnológica. Tesis Doctoral. Universidad de Girona.

- 44 Martínez López A., Cepeda Sáez A., Herrera Marteache A., Alonso Andicoberry C. (2011). *Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los estudios de vida útil para Listeria monocytogenes en determinados productos alimenticios*. Número de referencia: AESAN-2011-003.
- 45 Martino Zagovalov T.K., et al. (2005). *Determinación de Listeria spp. en Quesos y Embutidos Comercializados en Cuba*. Revista Cubana de Salud pública, julio-septiembre, año 2005 vol 31, número 003 Sociedad Cubana de Administración de Salud La Habana, Cuba pp. 217-222.
- 46 Mateauda Nova J.P. (2013). *Estudio de la microflora bacteriana y cambios físico químico en carne bovina envasada al vacío y almacenada en frío*. Universidad de la República Uruguay 2013. Tesis de Licenciatura.
- 47 Mendoza Guzmán V. (n.d.). *El riesgo de Listeria monocytogenes en productos cárnicos listos para consumir*. Universidad Autónoma de Chihuahua.
- 48 Mendoza Zambrano V.A. (2013). *Tipos de envolturas como influencia en la vida útil de salchicha de Tilapia (Oreuhromi ssp)* Tesis profesional. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí.
- 49 Menéndez García R.A. (2012). *Principales riesgos microbiológicos de los productos cárnicos crudo-curados envasados en atmósferas modificadas y/o vacío de interés económico en "Catilla y León"*. Universidad de León tesis Doctoral.
- 50 Michanie S. (2004). *Listeria monocytogenes la bacteria emergente de los 80*. Ganados & carnes; Buenos aires Argentina.

- 51 Ministerio de Economía. (1999). *Ramo de Economía Norma Salvadoreña NSO 67.02.13:98 Carne y Productos Cárnicos Embutidos Crudos y Cocidos.*
- 52 Molino Moreno S., et al. (2009). *Efecto de tiempo y temperatura de cocción en chorizo inoculados artificialmente con Listeria monocytogenes.* Pontificia Universidad Javeriana Bogotá. Vol. 14.
- 53 Mouwen J. & Prieto M. (1998). *Aplicación Del Sistema Aricpc-Haccp A La Industria Cárnica. Application Of Haccp System To Meat Industry, Ciency Technol Aliment, Vol.2: No1, 42-46,1998.*Dpto. Higiene y Tecnología de los Alimentos Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071, LEÓN, (España). Published online: 2009.
- 54 Müller S. G., Ardoino M. A. (2003). *Libro de procesamiento de carnes.* Proyecto gestión de la calidad en fábricas de embutidos. Procesamiento de carnes y embutidos elaboración, estandarización control de calidad. OEA/GTZ.
- 55 Muntual Begoña M. (2007). *Mejora de la seguridad alimentaria en productos cárnicos listos para el consumo mediante la aplicación combinada de tecnologías de conservación emergentes.* Universidad de Girona.
- 56 Muñoz A. I. (2012). *Distribución de serotipos de Listeria monocytogenes aislados de alimentos de Colombia 2000-2009.* vol. 32. Núm. 3 Revista del Instituto Nacional de Salud BIOMEDICA.
- 57 Navia D.P., Villeda H. S., Mosquera S. V. (2010). *Las Biopélculas en la Industria de alimentos.* Artículo Facultad de ciencias agropecuarias vol. 82.

- 58 Nolla Sales J. (2009). Listeriosis, Síntomas variables y mortalidad elevada. Hospital del Mar Barcelona. Consultada el 10 de diciembre de 2013. Página web: www.EROSKY CONSUMER. Ciencia y Tecnología de los Alimentos.
- 59 Okovic C., Michanie S. (1997). Alimentación Latinoamericana. Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en Salchichas por Hibridación de DNA. Buenos Aires Argentina.
- 60 OPS/OMS. (2007). *Vigilancia y Prevención de las enfermedades transmitidas por los alimentos*. Subcomité de planificación y programación del comité ejecutivo 29ª sesión.
- 61 Orihuel Iranzo E., et al. (2010). El control de *Listeria monocytogenes* persistente en la industria alimentaria. Consultada el 22 de febrero de 2014. Página web: <http://www.betelgeux.es>.
- 62 Pagán R., Condón S., y Sala F.J. (1997). "Effects of several factors on the heat-shock- induced Thermo tolerance of *Listeria monocytogenes*", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, n. 8.
- 63 Palacios A.C., Loyola W. (2010). "Elaboración de chorizo y salchicha Frankfurt a partir de proteína de soya (*Glycinemax*)". Ecuador.
- 64 Parrilla Valero F., Vaqué Rafart J. (2013). *Estudio de la incidencia de Listeriosis en España*. Agencia de Salud Pública de Cataluña, Department de Salut, Generalitat, de Cataluña, Barcelona España. Versión *On Line*.

- 65 Pérez Alarcón M. E. (2013). *Prevalencia de Listeria monocytogenes en salchichas tipo huacho provenientes de los mercados de abastos del cercado de Lima*. Lima Perú.
- 66 Restrepo Molina D.A. (2001). *Industria de la carne*. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Editado por la Universidad Nacional de Colombia en la ciudad de Medellín. Colombia.
- 67 Rivera H. F., et al. (2006). *Determinación microbiológica y molecular de Listeria spp. y Listeria monocytogenes en cerdas a nivel de una planta beneficiadora en EUA*. Revista científica, FCV-LUZ. Vol XVI, n° 3, 297-307.
- 68 Rodríguez Caseino M. J. (2005). *Preparación de masas y piezas cárnicas*. 1ª Edición. Ideas propias. Impreso en España, Editorial Vigo.
- 69 Rojas Rodríguez C. (2007). *Evaluación de cuatro desinfectantes sobre Listeria monocytogenes aislada de productos cárnicos crudos en Bogotá*. Bogotá D.C.
- 70 Romano Pérez M. A., Valladares Cortés C.E. (2012). *Pre diseño de una planta procesadora de productos cárnicos con enfoque de sistemas integrales de gestión*. Universidad de El Salvador. El Salvador.
- 71 Roos Robert. (2008). *Food borne Disease (Infectious-disease-topic/foodborne-disease); Listeria (infectious-disease-topics/listeria)*.
- 72 Ruíz Bolívar Z., Poutou Piñales A., Carrascal Camacho A.K. (2008). *Resistencia antimicrobiana y a desinfectantes de Listeria sp.*
- 73 Ruiz C. G., Córdova I. A. (n.d.). *Efecto del Frío y Atmósferas Modificadas sobre las Cualidades Sensoriales de la Carne en la Vida de Anaquel*,

Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma de Xochimilco, México. D.F.

- 74 Salgado Lizardo C.A. (2001). Evaluación técnica de una salchicha de desayuno elaborado en Zamorano. Zamorano Honduras.
- 75 Sánchez del Olmo A. (2012). *Evaluación del efecto antimicrobiano de la lactoferrina bovina y sus derivados, y su combinación con altas presiones, sobre patógenos y alterantes de la carne y productos cárnicos.* Universidad Complutense de Madrid. España.
- 76 Sánchez Escalante A. (2008). *Sistemas combinados de conservación para prolongar la vida útil de la carne y los productos cárnicos.* Sonora; México.
- 77 Sánchez Velázquez F. J. (2003). *Detección de Listeria monocytogenes y Listeria spp en puntos críticos establecidos en una planta procesadora de productos congelados para rápido consumo.* Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- 78 Sánchez Zacarías L. M., Pérez Sandoval D. A., Violantes Larios S. E. (2008). *“Diseño de un Plan de Mercadeo para Incrementar la demanda de los productos embutidos que comercializan las medianas empresas ubicadas en el área Metropolitana de San Salvador”.* Universidad Francisco Gavidia El Salvador.
- 79 Schobitz R., Ciampi L., Nahualquin Y. (2009). *Listeria monocytogenes un Peligro Latente para la Industria Alimentaria.* Instituto de Ciencia y Tecnología en los Alimentos, Instituto de producción y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile.

- 80 SENASICA. (n.d.). Manual de Buenas Prácticas de Manufactura y procedimientos operacionales de sanitización estándar, dirigida a la industria de empacadoras NOTIF de carnes frías y embutidos. Consultada el 25 de enero del 2014. Página web: www.sagarpa.gob.mx
- 81 Singh A., *et al.* (2003). "Efficacy of plant essential oils as antimicrobials agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. *Lebensm. Wiss. Technol*, vol. 36.
- 82 Tirado J., Paredes D., Velázquez G., Torres J. A. (2005). Microbiano en Productos Cárnicos Refrigerados. Ciencia y Tecnología de Alimentaria, diciembre 2005 vol.5.número 001 Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos Reynosa, México pp 66-76.
- 83 Tirado J.,*et al.* (2005). *Control de la Cadena de Frío en Productos Cárnicos refrigerados, Alfa Editores Técnicos.*
- 84 Torres K., *et al.* (2005). *Patogenesis de Listeria monocytogenes, Microorganismo Zoonótico emergente, Revista MVZ vol. 10, Córdoba, Universidad de Córdoba Montería, Colombia* pág. 511-543.
- 85 Tovar Pérez G. I., *et al.* (2005). *Listeria* una aproximación práctica al microorganismo. Universidad Autónoma Metropolitana de México. Consultada el 16 de junio de 2014. Página web: www.revista.unam.mx.Vol6.
- 86 USDA, (2013).Servicio de inocuidad e inspección de los alimentos. Las salchichas (Hot dogs) y la inocuidad alimentaria. Consultado el 8 de julio de 2014, página web: www.fsis.usda.gov/wps/wcm/.../Hot_dogs___food_safety_SP.pdf?...

- 87 Valero Diaz A. (2006). *Aplicaciones de modelos predictivos en evaluación de riesgos de L.m. en alimentos mínimamente procesados.2006.*
- 88 Vanderzant C. (1992). *Compendium of Methods For the Microbiological Examination of Food .American Public Health Association, third edition. Washington D.C.*
- 89 Villalobos de Bastardo L.B., Martínez Nazareth R. E. (2006). *Suceptibilidad antimicrobiana de Listeria spp, aislada de alimentos durante el período 2003-2004. Cumaná, Venezuela. 2006.Revista de la sociedad Venezolana de Microbiología 26: 31-34.*

A N E X O S

Tabla No.11
Análisis Estadístico tiempo T0

Tiempo de almacenamiento T0 (comprende el momento de la inoculación hasta un tiempo adicional de cuatro horas hasta el análisis)

Factores: Empaque y temperatura

Factores		Etiqueta del valor	N
EMPAQUE	1	VACIO	12
	2	GRANEL	12
TEMPERATURA	5	5° C	12
	25	25° C	12

Tabla No.12
Media y desviación estándar en UFC/g

Variable dependiente: **T0**

EMPAQUE	TEMPERATURA	Media	Desviación típica	N
VACIO	5° C	84.67	4.227	6
	25° C	142.00	4.858	6
	Total	113.33	30.254	12
GRANEL	5° C	296.00	5.657	6
	25° C	796.50	61.880	6
	Total	546.25	264.714	12
Total	5° C	190.33	110.468	12
	25° C	469.25	344.354	12
	Total	329.79	287.824	24

Tabla No.13
Análisis de varianza en UFC/g
Tomando las interacciones empaque y temperatura

T0

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1885863.125 ^a	3	628621.042	644.315	.000
Intersección	2610301.042	1	2610301.042	2675.471	.000
EMPAQUE	1124501.042	1	1124501.042	1152.576	.000
TEMPERATURA	466767.042	1	466767.042	478.421	.000
EMPAQUE * TEMPERATURA	294595.042	1	294595.042	301.950	.000
Error	19512.833	20	975.642		
Total	4515677.000	24			
Total corregida	1905375.958	23			

a. R cuadrado = .990 (R cuadrado corregida = .988)

Tabla No.14
Prueba de comparaciones múltiples Tukey T0
Para las interacciones de empaque y temperatura.

DHS de Tukey^{a,b}

INTERACCION	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
VACIO 5C	6	84.67			
VACIO 25C	6		142.00		
GRANEL 5C	6			296.00	
GRANEL 25C	6				796.50
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 975.642.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000

b. Alfa = .05.

Tabla No.15
Análisis Estadístico T1

Factores: Empaque y temperatura

Tiempo de almacenamiento T1

Factores		Etiqueta del valor	N
EMPAQUE	1	VACIO	12
	2	GRANEL	12
TEMPERATURA	5	5° C	12
	25	25° C	12

Tabla No.16
Estadísticos Descriptivos
Media y desviación st en UFC/g

Variable dependiente: **T1**

EMPAQUE	TEMPERATURA	Media	Desviación típica	N
VACIO	5° C	197.67	5.279	6
	25° C	229.33	6.532	6
	Total	213.50	17.480	12
GRANEL	5° C	618.00	11.524	6
	25° C	1206.50	56.973	6
	Total	912.25	309.823	12
Total	5° C	407.83	219.678	12
	25° C	717.92	511.771	12
	Total	562.88	416.443	24

Tabla No.17
Análisis de varianza en UFC/g
Tomando las interacciones empaque y temperatura

T1

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	3971514.458 ^a	3	1323838.153	1535.226	.000
Intersección	7603878.375	1	7603878.375	8818.050	.000
EMPAQUE	2929509.375	1	2929509.375	3397.288	.000
TEMPERATURA	576910.042	1	576910.042	669.030	.000
EMPAQUE *	465095.042	1	465095.042	539.360	.000
TEMPERATURA					
Error	17246.167	20	862.308		
Total	11592639.000	24			
Total corregida	3988760.625	23			

a. R cuadrado = .996 (R cuadrado corregida = .995)

Tabla No. 18
Prueba de comparaciones múltiples Tukey T1
Para las interacciones de empaque y temperatura.

DHS de Tukey^{a,b}

INTERACCION	N	Subconjunto		
		1	2	3
VACIO 5C	6	197.67		
VACIO 25C	6	229.33		
GRANEL 5C	6		618.00	
GRANEL 25C	6			1206.50
Sig.		.273	1.000	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos

Basadas en las medias observadas

El término de error es la media cuadrática (Error) = 862.308

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000

b. Alfa = .05

Tabla No.19
Análisis Estadístico T2

Factores: Empaque y temperatura
Tiempo de almacenamiento T2

Factores		Etiqueta del valor	N
EMPAQUE	1	VACIO	12
	2	GRANEL	12
TEMPERATURA	5	5° C	12
	25	25° C	12

Tabla No. 20
Estadísticos Descriptivos
Media y desviación set en UFC/g

Variable dependiente: **T2**

EMPAQUE	TEMPERATURA	Media	Desviación típica	N
VACIO	5° C	337.33	34.279	6
	25° C	525.00	53.584	6
	Total	431.17	106.978	12
GRANEL	5° C	639.17	68.974	6
	25° C	1475.00	83.439	6
	Total	1057.08	442.560	12
Total	5° C	488.25	165.961	12
	25° C	1000.00	500.606	12
	Total	744.12	448.716	24

Tabla No.21
Análisis de varianza en UFC/g
Tomando las interacciones empaque y temperatura

T2

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gol	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	4552138.458 ^a	3	1517379.486	384.984	.000
Intersección	13289328.375	1	13289328.375	3371.721	.000
EMPAQUE	2350630.042	1	2350630.042	596.393	.000
TEMPERATURA	1571328.375	1	1571328.375	398.672	.000
EMPAQUE *	630180.042	1	630180.042	159.887	.000
TEMPERATURA					
Error	78828.167	20	3941.408		
Total	17920295.000	24			
Total corregida	4630966.625	23			

a. R cuadrado = .983 (R cuadrado corregida = .980)

Tabla No. 22
Prueba de comparaciones múltiples Tukey T2
Para las interacciones de empaque y temperatura.

DHS de Tukey^{a,b}T2

INTERACCION	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
VACIO 5C	6	337.33			
VACIO 25C	6		525.00		
GRANEL 5C	6			639.17	
GRANEL 25C	6				1475.00
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos. Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 3941.408.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000

b. Alfa = .05.

Tabla No. 23
Análisis Estadístico T4

Factores: Empaque y temperatura

Tiempo de almacenamiento T4

		Etiqueta del valor	N
INTERACCION	1.00	VACIO 5C	6
	2.00	GRANEL 5C	6
	3.00	VACIO 25C	6
	4.00	GRANEL 25C	6

Tabla No. 24
Estadísticos Descriptivos
Media y desviación set en UFC/g

Variable dependiente: T4

INTERACCION	Media	Desviación típica	N
VACIO 5C	550.67	48.173	6
GRANEL 5C	819.17	45.797	6
VACIO 25C	737.50	61.880	6
GRANEL 25C	2085.83	49.386	6
Total	1048.29	621.803	24

Tabla No.25

Análisis de varianza en UFC/g
Tomando las interacciones empaque y temperatura

Variable dependiente:T4

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	8839278.458 ^a	3	2946426.153	1102.900	.000
Intersección	26373970.042	1	26373970.042	9872.253	.000
EMPAQUE	3921225.042	1	3921225.042	1467.785	.000
TEMPERATURA	3168993.375	1	3168993.375	1186.211	.000
EMPAQUE *	1749060.042	1	1749060.042	654.705	.000
TEMPERATURA					
Error	53430.500	20	2671.525		
Total	35266679.000	24			
Total corregida	8892708.958	23			

a. R cuadrado = .994 (R cuadrado corregida = .993)

Tabla No. 26
Prueba de comparaciones múltiples Tukey T4
Para las interacciones de empaque y temperatura.

DHS de Tukey^{a,b}T4

INTERACCION	N	Subconjunto		
		1	2	3
VACIO 5C	6	550.67		
VACIO 25C	6		737.50	
GRANEL 5C	6		819.17	
GRANEL 25C	6			2085.83
Sig.		1.000	.057	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 2671.525.

Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000

b. Alfa = .05.

Resultados analíticos

Tabla N° 27

Crecimiento obtenido en salchicha empacada a vacío y almacenada a 5°C

Concentración del inóculo Dil 10 ⁻⁶ UFC/mL	To UFC/g	T1 UFC/g	T2 UFC/g	T4 UFC/g	T8 UFC/g	T16 UFC/g	T32 UFC/g
99	89	196	360	472	354	200	69
105	80	197	354	531	413	196	68
96	79	189	336	590	472	188	65
102	85	200	380	590	413	208	62
103	88	199	299	531	472	220	73
97	87	205	295	590	354	216	75
\bar{X} 100.33	84.67	197.67	337.33	550.67	413	204.67	68.67

Tabla N° 28

Crecimiento obtenido en salchicha empacada a vacío y almacenada en 25°C

Resultados UFC/g Vacío 25°C			
T0	T1	T2	T4
140	220	513	708
135	232	590	826
148	236	472	767
139	228	513	767
146	224	590	708
144	236	472	649
\bar{X} 142	229.3	525	737.5

Tabla N° 29

Crecimiento obtenido en salchicha empacada a granel y almacenada a 5°C

Resultados UFC/g Granel 5°C					
T0	T1	T2	T4	T8	
300	620	649	767	1298	
288	612	590	826	1416	
296	632	708	767	1239	
304	600	708	826	1357	
292	616	649	844	1298	
296	628	531	885	1239	
\bar{X}	296	618	639.2	819.2	1307.8

Tabla N° 30

Crecimiento obtenido en salchicha empacada a vacío y almacenada a 25°C

Resultados UFC/g Granel 25°C				
T0	T1	T2	T4	
767	1180	1475	2065	
826	1280	1416	2065	
885	1239	1534	2124	
826	1121	1475	2006	
767	1180	1357	2131	
708	1239	1593	2124	
\bar{X}	796.5	1206.5	1475	2085.8

Tabla No. 31
Resultados Humedad y pH

Resultados Humedad y pH durante el almacenamiento								
Tiempo	Granel 25°C		Vacio 25°C		Granel 5°C		Vacio 5°C	
	PH	Humedad	pH	Humedad	pH	Humedad	pH	Humedad
T0	6.63	67.52	6.58	69.40	6.69	68.04	6.87	68.74
T1	5.98	67.30	6.59	68.55	6.47	66.79	6.82	68.53
T2	5.4	68.38	6.11	67.95	6.80	67.23	6.83	68.07
T4	5.10	69.04	5.21	66.33	6.57	68.13	6.79	67.47
T8					4.55	70.68	4.99	66.15
T16							4.88	65.54
T32							4.75	65.05

Figura No.17- Preparación de Diluciones de Inóculo *Listeria monocytogenes*

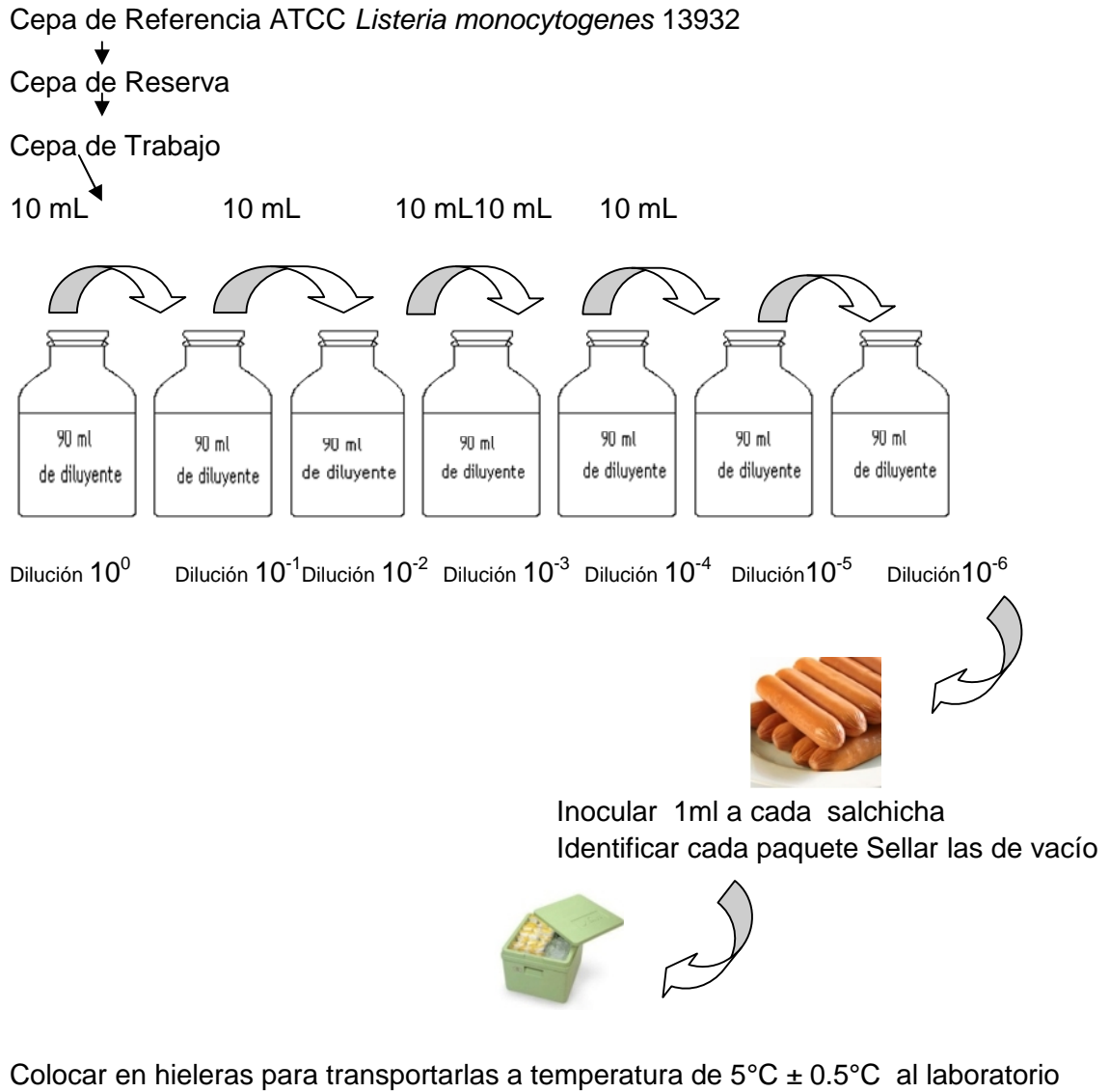
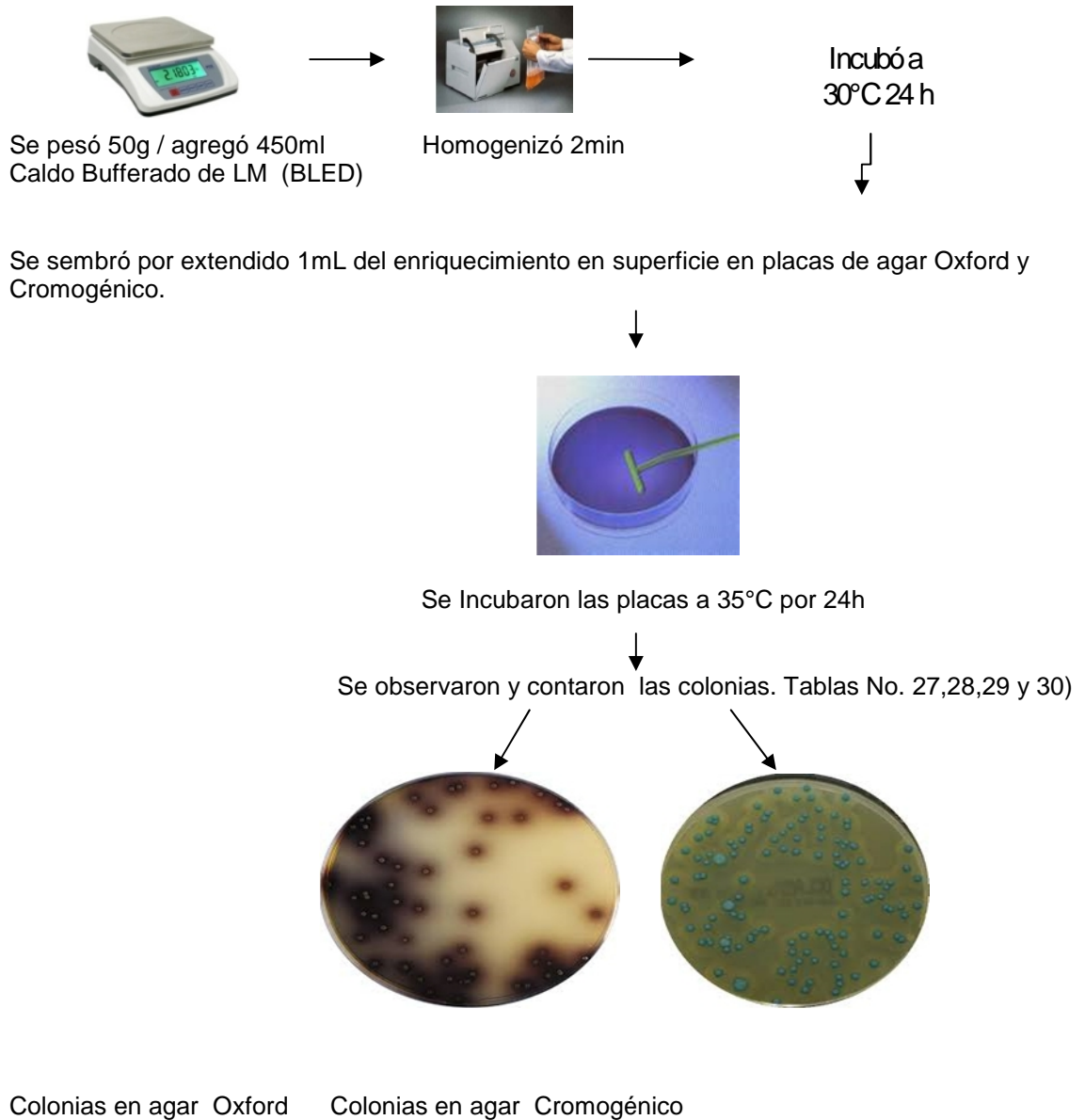
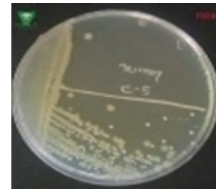
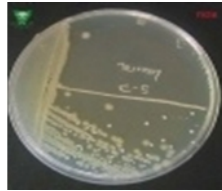


Figura No.18 - Procedimiento Metodología Tradicional B.A.M *On line*

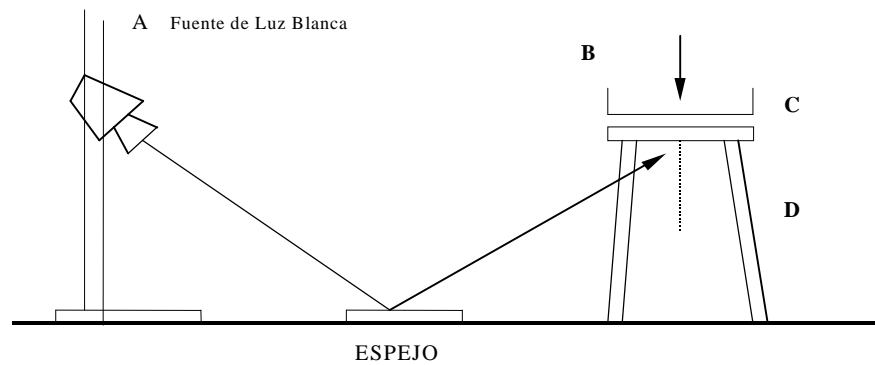


De las colonias desarrolladas en las placas de agar Oxford y agar Cromogénico

Se sembró por estrías en agar Trytica Soya y se incubó a 35°C/24h



Se observaron las colonias con el sistema Henry



Las colonias se observaron con color azul tornasol por efecto de la luz reflejada en el fondo de la placa. De estas colonias se realizaron las pruebas bioquímicas API (fig. 22), fermentación de azúcar (fig. 20), prueba de hemólisis (cuadro N°6), movilidad (fig. 21 y CAM test (fig23)

Cuadro No. 4

**Lista de verificación de los Aspectos Sanitarios Generales de los
Establecimientos Alimentarios**

N°	Aspectos a verificar	Puntaje máximo	Calificación			Observaciones de Primera Inspección
			Inspección	Re inspección		
				1	1	
1	UBICACIÓN Y ALREDEDORES	2				
1.1	Situado en zonas o lugares no expuestos a contaminación. Distancia de fuentes de contaminación cumple norma.	1	Si			
1.2	Alrededores y áreas exteriores están limpios, libres de maleza, estancamiento de agua, promontorios de basura y polvo.	1	No			Existen áreas descubiertas por el cual puede entrar polvo.
2	INSTALACIONES FISICA	2				
2.1	Tamaño, construcción y diseño del local facilita su mantenimiento y operaciones sanitarias.	1	Si			Local pequeño pero el equipo está dispuesto en línea de acuerdo al proceso.
2.2	Área de preparación y almacenamiento de alimentos, con barreras efectivas para impedir ingreso de plagas, vectores y otros contaminantes como polvo.	1	No			Se observaron trampas para ratones pero el área de cocimiento tiene malla ciclón.
3	PISOS	2				
3.1	De materiales adecuados para evitar contaminación de alimentos. Facilitan procesos de limpieza y sanitización. Sin daños ni grietas.	1	Si			Piso afinado y fácil de lavar
3.2	Desagües permiten evacuación rápida del agua en áreas de preparación de alimentos, y están protegidos para impedir ingreso de plagas.	1	Si			Los desagües protegidos con rejillas y con inclinación adecuada.
4	PAREDES Y TECHOS	4				
4.1	Techos en buen estado. Adecuado mantenimiento. No acumulan suciedad e impide ingreso de plagas y vectores. Sin filtración de agua, goteras ni desprendimiento de partículas.	1	No			Provisto de cielo falso pero se observó manchado de goteras.
4.2	Paredes internas lisas, fáciles de lavar, de color claro y no absorben humedad.	1	Si			Tiene paredes lisas pero hay una parte que se encontró descascarada.
4.3	En casos se cuente con cielo falso, se mantiene en buen estado y limpios (incluye espacio entre enclelado con el plafón o techo).	1	No			Se observó manchado de goteras
5	VENTANAS Y PUERTAS	3				
5.1	En áreas de preparación y almacenamiento de alimentos las ventanas y otras aberturas de ventilación protegen de forma efectiva contra ingreso de plagas. Si emplea cedazo, son de fácil desmontaje para su limpieza.	2	Si			
5.2	Repisas de ventanas de tamaño mínimo y con declive para evitar acumulación de polvo y no se usa para almacenar objetos.	1				No se observaron ventanas espacio cerrado.
6	ILUMINACIÓN Y VENTILACIÓN	6				
6.1	La iluminación cumple con los estipulados. Las lámparas ubicadas en áreas de recibo de materia prima, almacenamiento, preparación y manejo de los alimentos, están protegidas contra roturas.	1	No			Las luminarias están colgando.

6.2	Instalaciones eléctricas empotradas o recubiertas por caños aislantes. No presencia de cables colgantes en zona de preparación de alimentos.	0	No		Se observaron conexiones externas.
6.3	Sistema efectivo de ventilación natural o artificial (no aplica para panadería artesanal).	1	Si		Con aire acondicionado, pero no cuenta con extractores.
6.4	Equipos artificiales para ventilación (extractores de aire, aire acondicionado, ventiladores y otros), en buen estado y limpios. Reciben mantenimiento.	1	Si		
7	CANTIDAD Y CALIDAD DEL AGUA	8			
7.1	Dispone de agua potable en todas las áreas requeridas.	2	Si		Se mostraron los análisis de laboratorio para el agua.
7.2	Instalaciones apropiadas para almacenamiento y distribución. Cisterna o tanque de agua protegido. Se lava y desinfecta cada seis meses. Se observa limpio por dentro y por fuera. Está incluido en programa de limpieza y desinfección.	3	Si		Se mostraron procedimientos de sanitización que se verifica.
7.3	Lectura de cloro residual según normativa (0.3-1.1 mg/l).	1	Si		Se mostraron registros de lectura de cloro.
7.4	Cuando se cuente con filtros u otras alternativas para el tratamiento del agua, el responsable presenta registro de limpieza y mantenimiento de las alternativas	2	Si		Los filtros funcionando adecuadamente.
8	SISTEMA DE DESAGÜE, MANEJO Y DISPOSICIÓN DE DESECHOS LIQUIDOS Y SÓLIDOS	6			
8.1	Conectado al alcantarillado, o con sistema de tratamiento de aguas negras y servidas.	1	Si		Se recoge las aguas residuales y se les da tratamiento.
8.2	Sistema de desagüe, drenajes, tuberías de aguas negras y servidas, en buen estado y funcionando adecuadamente, sin riesgo de contaminar agua potable.	2	Si		
8.3	Sistemas de desagüe y drenajes protegidos con rejillas y cedazo. Tapones tipo sifón que impiden el ingreso de vectores.	1	Si		
8.4	Trampa de grasa instalada, en buen estado y uso apropiado. Se da mantenimiento en la frecuencia necesaria (Aplica si el establecimiento descarga residuos grasos según tipos y cantidad de alimentos que elabora).	2	No		No se observó.
9	DESECHOS SÓLIDOS	7			
9.1	Basureros activados por pedal, suficientes en número y ubicación, con tapadera ajustada, de superficie lisa, fáciles de lavar, con bolsa plástica en su interior. Se lavan y desinfectan. Depósito temporal según normativa.	2	Si		Sí todos los basureros de pedal y hay suficientes.
9.2	Depósitos para desechos sólidos ubicados en zonas externas cuentan con tapadera hermética. Se mantienen con bolsas plásticas y cerradas.	2	Si		
9.3	Depósitos generales de desechos sólidos ubicados lejos de área de preparación y almacenamiento de alimentos. Se mantiene limpio, sin lixiviados. Basura se coloca en recipientes cerrados o bolsas plásticas anudadas.	2	Si		Todos los basureros se encontraron con tapadera.
9.4	Disposición final de desechos sólidos adecuada según norma.	1	Si		
10	INSTALACIONES SANITARIAS	6			
10.1	Cuenta con servicios sanitarios para trabajadores fuera del área de procesamiento, separados por sexo e identificados. Accesibles, ventilados e iluminados, de fácil lavado, en buen estado, limpios y no se emplea como bodega.	2	Si		

10.2	Área de procesamiento de alimentos cuenta con lavamanos, limpio y con abastecimiento de agua. Provisto de jabón líquido sin aroma, toallas de papel o secadores de aire y rótulos que indiquen al trabajador el lavado de manos.	1	Si		Se encontró pegado a la pared el procedimiento para lavado de manos.
10.3	Cuenta con servicio sanitario separado por sexo, con lavamanos en buen estado y limpio. Dotado de jabón líquido sin aroma, toallas desechables o secadores de aire. No aplica a establecimientos alimentarios que funcionen de forma exclusiva como salas de venta de productos terminados, con capacidad de atención para menos de 25 clientes, los cuales deben disponer de lavamanos con agua y jabón líquido sin aroma.	2	Si		
10.4	Número de inodoros, y urinarios acorde con norma.	1	No		No hay suficientes
11	LIMPIEZA Y DESINFECCION	9			
11.1	Cuenta con programa de limpieza y desinfección, y registros diarios de cumplimiento.	2	Si		Se mostraron los SSOP establecidos para las distintas áreas y sus registros diarios.
11.2	Refrigeradoras, freidoras, hornos, planchas y otros, se mueven para facilitar operaciones de limpieza.	1	Si		
11.3	Platos, tazas, cubiertos se lavan y desinfectan según norma.	1	Si		Se observaron los procesos para cuchillos.
11.4	Se observa adecuadas condiciones de limpieza y desinfección en todas las superficies, puertas, ventanas, techos, carcasas, charolas, rejillas, repisas, equipos y todas las áreas.	2	Si		
11.5	Productos de limpieza y desinfección son adecuados para el uso en establecimientos alimentarios. Se emplean de acuerdo a especificaciones y están etiquetados.	2	Si		Si están etiquetados. No se usan desinfectantes apropiados. (Se le concedió un punto menos).
12	DISEÑO DE EQUIPO Y UTENSILIOS	9			
12.1	Materiales de equipos y utensilios no son corrosivos ni generan riesgo de contaminación de los alimentos. No emplean madera u otros materiales absorbentes.	2	Si		Los equipos son de acero inoxidable incluyendo mesas de trabajo.
12.2	Equipo fijo es accesible para su operación y mantenimiento. Permite una limpieza fácil, efectiva y segura.	2	Si		Se encuentran dispuestos en línea y con separación de la pared.
12.3	Utensilios se guardan adecuadamente en muebles que no permiten el ingreso de insectos y roedores.	2	No		
12.4	Tablas para picar, son de acrílico o polietileno, sin hendiduras y se emplean de forma específica según tipo de producto. Se lavan y desinfectan después de cada uso.	2	No		
12.5	Mantas para limpiar mesas y otras superficies están limpias.	1	No		No se observó.
13	CONTROL DE INSECTOS Y ROEDORES	8			
13.1	Presentan programa de control de prevención de plagas.	1	Si		Si se evidenció el programa.
13.2	Servicios de control de plagas, prestados por empresa avalada por autoridad competente. El encargado del establecimiento presenta documentación respectiva. En caso no subcontrate a empresa, presenta hojas técnicas de los productos y se emplean conforme a lo descrito en hojas técnicas. Son adecuadas para el uso en establecimientos alimentarios.	3	Si		Cuenta con un contrato anual con empresa que presta estos servicios específicos a la industria del alimento.
13.3	Métodos de control de plagas (físicas/químicas) son efectivas.	1	Si		

13.4	No emplean cebos para roedores en áreas de preparación de alimentos. Se protegen a los alimentos antes y después de aplicar plaguicidas.	2	Si		Explicaron que no se procesa cuando hay que realizar esta actividad.
13.5	No se observan equipos ni objetos inservibles o en desuso, que puedan ser un riesgo para la cría y proliferación de insectos y roedores.	1	Si		
14	HIGIENE DEL PERSONAL Y REQUISITOS SANITARIOS	20			
14.1	Manipuladores de alimentos han recibido educación sanitaria, a través de los cursos que se imparten por los establecimientos de salud cuenta con Programa de Capacitación en BPM que ha sido avalado por el MINSAL, impartido por una entidad especializada en el área.	2	Si		Se encontraron registros de las capacitaciones a los empleados.
14.2	El propietario de la empresa o establecimiento alimentario tiene copia u originales de los resultados de laboratorio y las recomendaciones médicas de los manipuladores de alimentos.	2	Si		Los mantiene encargado de aseguramiento de calidad y manifestó que se explican en reuniones.
14.3	No se observan manipuladores con síntomas según lo que dicta el Art.61 de la presente norma.	2	Si		Explicaron que si un trabajador está con gripe o diarrea no labora en
14.4	Existen las condiciones y exigencias para que los manipuladores se lavén las manos frecuente y minuciosamente, con agua potable y jabón líquido sin aroma. Se observa que el personal practica el lavado de manos según norma.	2	Si		Se cuenta con el procedimiento de lavados de manos. Los lavabos son de pedal.
14.5	Los manipuladores de alimentos usan uniforme completo: gorro o redecilla, gabacha o delantal color claro, zapatos cerrados adecuados al área de trabajo. No usan vestidos, camisas o blusas sin mangas.	2	Si		Se observó al personal todos con uniforme completo, limpio y de color blanco, botas de hule blancas.
14.6	El personal que sirve los alimentos al cliente usa gorro o redecilla, zapatos cerrados y uniforme con camisa de color claro.	1	Si		Se observó un despacho de producto.
14.7	Los manipuladores de alimentos no usan anillos, aretes, pulseras, relojes, adornos, u otras joyas. Mantienen las uñas recortadas, limpias y sin esmalte.	1	Si		Se comprobó en el personal que estaba laborando.
14.8	No se observan manipuladores fumando, masticando chicle, escupir, comer en las horas laborables. Estornudar, toser, hablar o bostezar sobre los alimentos. Rascarse, tocarse el cabello y la cara, tocarse la nariz u oídos, mientras se encuentren manipulando alimentos.	1	Si		Personal bien entrenado
14.9	Cuando se sirven alimentos se usan pinzas o guantes o se asigna a una persona exclusiva para el cobro, cuando aplique.	2	Si		Facturación y cobro lo desempeñan otras personas ajenas al de despacho de producto.
14.10	Ropa de trabajo, incluyendo botas, se encuentran limpias. No se emplea ropa de trabajo (gabacha y botas), fuera de las áreas de procesamiento.	2	No		Se observó personal de producción con la ropa de trabajo fuera del área.
14.11	No se mantienen artículos personales ni prendas de vestir, sobre equipo y utensilios o en áreas de producción. Cuentan con armarios habilitados para ello.	2	Si		No contaban con armarios, pero no se encontró evidencia de artículos personales dentro del área.
14.12	No se mantienen mascotas ni animales domésticos en el interior del establecimiento alimentario (áreas de procesamiento, almacenamiento y manipulación de alimentos).	1	Si		No se observó ninguno dentro de las áreas.
15	CONSERVACIÓN DE LAS MATERIAS PRIMAS, EMPAQUES, MANEJO DE SUSTANCIAS QUÍMICAS Y REGISTROS SANITARIOS	8			
15.1	Alimentos perecederos se conservan a temperaturas según norma.	1	Si		Se encontraron refrigerados a 4°C

15.2	Equipos refrigerantes no sobrepasan capacidad de carga.	1	Si			
15.3	Se implementan el método Primeras Entradas Primeras Salidas. No hay productos ni materias primas vencidas ni deterioradas.	2	Si			
15.4	Productos químicos y plaguicidas almacenados en lugares seguros, con llave, lejos de las materias primas, en recipientes cerrados y debidamente etiquetados.	2	Si			
15.5	Productos envasados y aditivos alimentarios, cuentan con Registro Sanitario.	1	Si			Se mostraron evidencias que son de proveedores reconocidos.
15.6	Empaques y envases para el producto final, protegidos de contaminación, y almacenados en condiciones higiénicas.	1	No			Bodega pequeña y no está bien sellada del techo.
Total PMA		100				
Total SPO						
Total PN/A						
CALIFICACIÓN SANITARIA ASPECTOS SANITARIOS GENERALES Fórmula Calificación obtenida: $\frac{SPO}{PMA-PN/A} \times 100$						

Formula Calificación obtenida:

$$\frac{SPO}{PMA-PN/A} \times 100$$

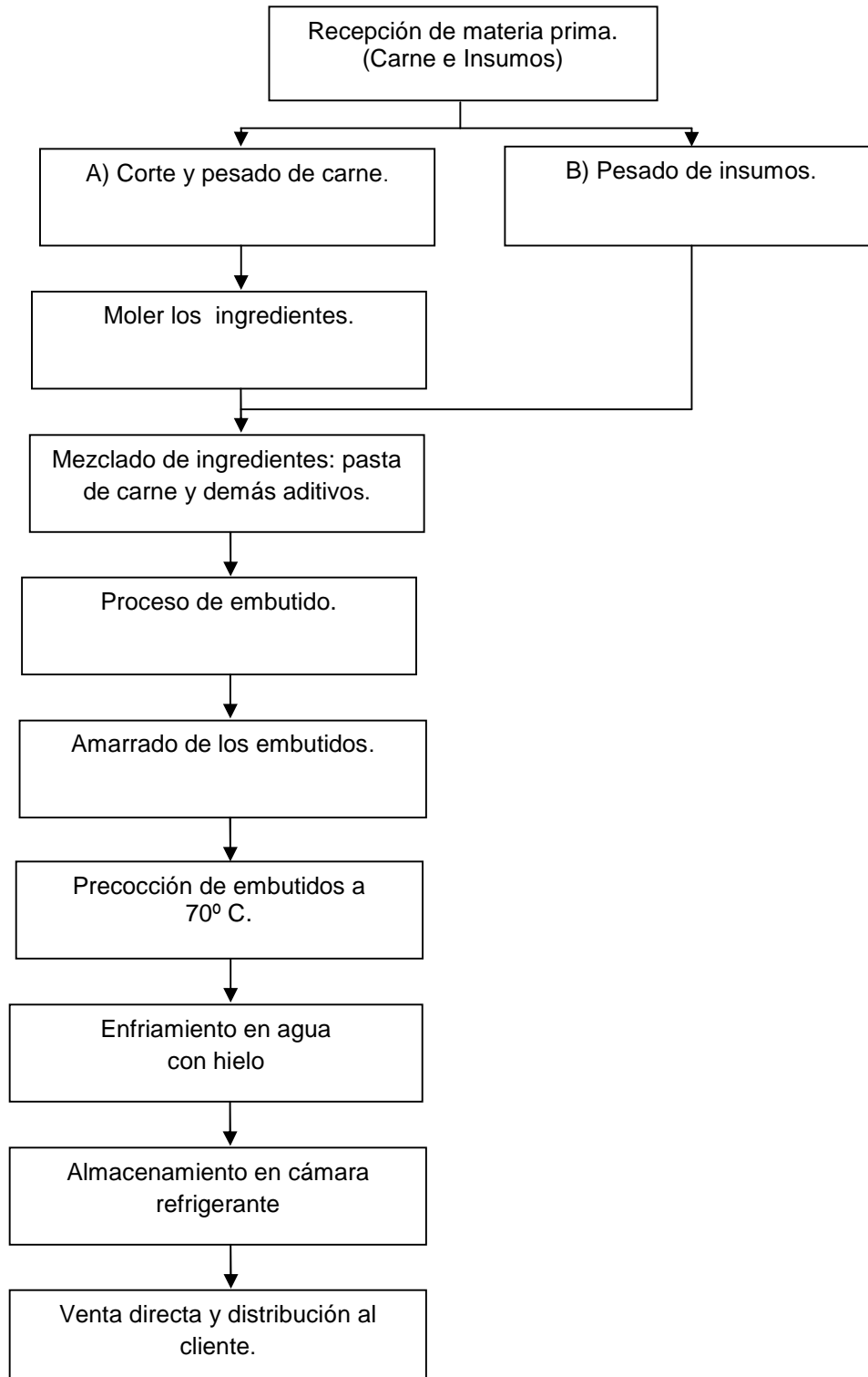
Donde SPO: suma de puntos obtenidos

PMA: puntaje máximo asignado

PN/A: puntos que no aplican

Cuando el aspecto a evaluar exigido por la norma no sea necesario (Escribir N/A en el interior de la casilla de la tabla de calificación).

Tomado del Diario Oficial Tomo No.398 – Ministerio de Salud – Ramo de Salud – Acuerdo No.150 S.S. 1 de febrero de 2013 – Página #36

Figura No. 19 - Proceso de elaboración de Salchicha

Cuadro No. 5

Diferenciación y Características de las Especies del Género *Listeria*

Características	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. grayi</i>
Coloración Gram (+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Prueba de catalasa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Movilidad en paraguas	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Producción de ácido a partir de :						
Glucosa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Manitol	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
D – Xilosa	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
L-Ramnosa	(+)	(+/-)a	(-)	(+/-)a	(-)	(-)
Maltosa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Hidrólisis de esculina	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
□ Hemólisis	(+)b	(-)	(+)	(-)	(+)c	(-)
Prueba de CAMP (<i>Staphylococcus aureus</i>)	(+)d	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
Prueba de CAMP (<i>Rhodococcusequi</i>)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)

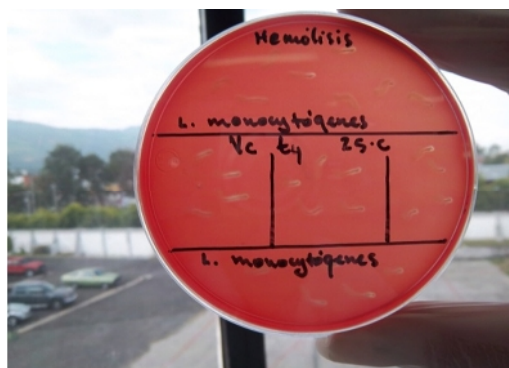
Fuente: Seeliger and Jones, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1986 Pérez Alarcón 2013

Cuadro No.6 – Reacciones Hemólisis especies de *Listeria*

Especies	Interacciones Hemolíticas	
	<i>Staphylococcus aureus</i> (S)	<i>Rhodococcus equi</i> (R)
1- <i>Listeria seeligeri</i>	+	-
2- <i>Listeria ivanovii</i>	-	+
3- <i>Listeria innocua</i>	-	-
4- <i>Listeria welshimeri</i>	-	-
5- <i>Listeria monocytogenes</i>	+	- (^a)

(^a) Raras cepas son S+ y R+, pero la reacción de R+ es mucho menos pronunciada que la de *Listeria ivanovii*.

Listeria monocytogenes produce una ligera zona clara alrededor de la punzada.



Cuadro No.7 – Reacciones diferenciales de especies de *Listeria*

Especie	Hemólisis (Beta) ^(a)	Reducción de Nitratos	Producción de ácido de		
			Manitol	Ramnos a	Xilosa
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	-	+	-
<i>L. Ivánovo</i>	+	-	-	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-	-	V ^(b)	-
<i>L. welshemeri</i>	-	-	-	V ^(b)	+
<i>L. belígera</i>	+	-	-	-	+
<i>L. grayi</i> ^(c)	-	V	+	V	-

^(a) Punzada en sangre de oveja ^(c) *L. grayi* reducción de nitratos, variables a ramnos a *L. murrayi*. ^(b) V, Variable

Cuadro No. 8 – Norma Salvadoreña 67.02.13:98 Carnes y Productos Cárnicos Embutidos.

Producto	Recuento Total aeróbico 32°C	Salmonella spp	Staphylococcus Aureus	Clostridium perfringens	Escherichia coli		Coliformes Totales		Listeria Monocytogenes
					UFC/g	NMP/g	UFC/g	NMP/g	
Precocido listo para comer (mortadela)	1 x 10 ⁻⁵ UFC/g máx.	Ausente en 25g	10 UFC/g máx.	10 UFC/g máx.	10 máx.	0.4máx.	100 máx.	15 máx.	Ausencia /g
Precocido normalmente requiere cocimiento antes de ser consumido (salchichas y hot dog)	1 x 10 ⁻⁵ UFC/g máx.	Ausente en 25g	10 UFC/g máx.	10 UFC/g máx.	10 máx.	0.4máx.	100 máx.	15 máx.	Ausencia /g
Crudo, requiere cocimiento antes de ser consumido (longaniza, salchicha de desayuno)	1 x 10 ⁻⁶ UFC/g máx.	Ausente en 10g	100 UFC/g máx.	100 UFC/g máx.	100 máx.	15 máx.	1000 máx.	150 máx.	Ausencia /g
Curados, pueden ser ingeridos sin cocción adicional (chorizo extremeño, salami Italiano)	1 x 10 ⁻⁵ UFC/g máx.	Ausente en 25g	10 UFC/g máx.	10 UFC/g máx.	10 máx.	0.4máx.	100 máx.	15 máx.	Ausencia /g

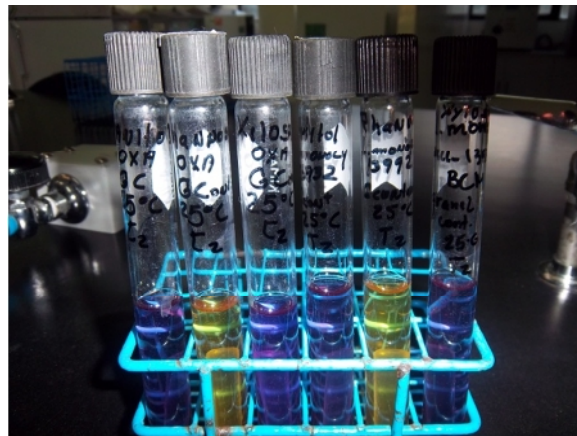
Figura No. 20–Fermentación de Azúcares



Caldo base Púrpura de Bromocresol
Suplementado con Azúcar.
Ramnosa, Manitol, Xylosa



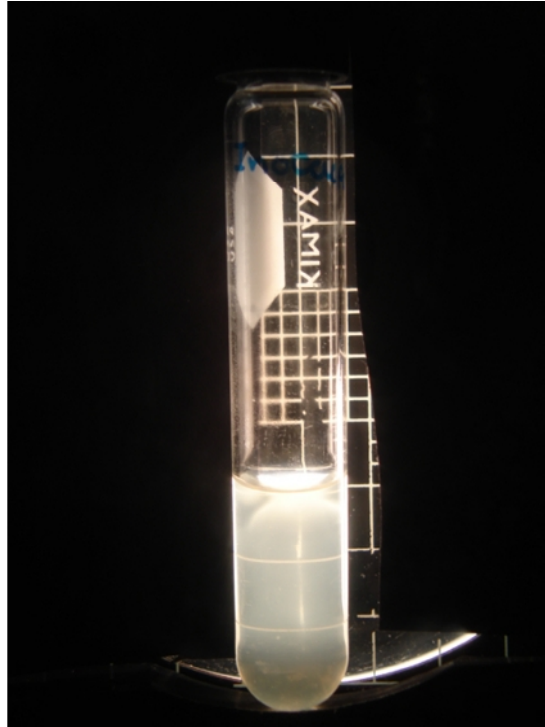
Reacción positiva de fermentación
de azúcares



Fermentación de azúcares:
Xilosa, Rhamnosa y Manitol

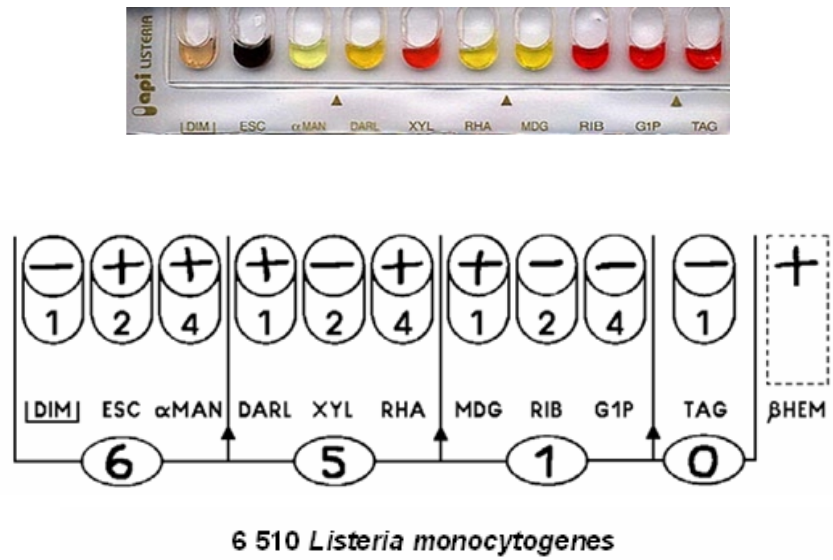
Figura No. 21 – Movilidad (sombrilla)

**Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en MEDIO SIM
(Sulfuro-Indol-Movilidad)**



Se observa el crecimiento de la bacteria tipo paraguas de 3 a 5mm. La movilidad es más pronunciada a la T° ambiente que a 37°C y el cultivo móvil aparece como disco de crecimiento a unos 2mm x debajo de la superficie.

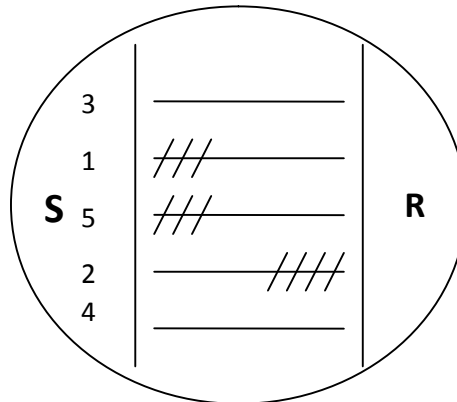
Figura No. 22 – Lectura e interpretación de la Galería de API *Listeria*



Bionúmero 6510 identificación *Listeria monocytogenes*



Figura No. 23 –CAM Test



Las líneas verticales representan los inoculos de *Staphylococcus aureus* (S) y *Rodococcus equi* (R). Las líneas horizontales representan 5 cepas inoculadas, de la siguiente forma 1) *L.seeligeri*, 2) *L.ivanovii*, 3)*L.innocua*, 4)*L. welshimeri*, 5) *L. monocytogenes*. Las líneas inclinadas indican de forma diagramática la localización de la región de hemolisis. Los cultivos estriados de forma horizontal no deben tocar la línea vertical del cultivo estriado.

Cuadro No.9 - Certificado de análisis de Cepas Patrones.

ATCC®

Certificate of Analysis

ATCC NUMBER: 13932

ORGANISM: *Listeria monocytogenes*

LOT: 3515166

EXPIRATION DATE: 2029-03

PRODUCT DESCRIPTION: Bacterial cells suspended in an appropriate cryoprotectant.

STORAGE: +2°C to +8°C for freeze-dried cultures
-20°C or lower for frozen culturesNote: Do not store in freezers with a defrost cycle. This will expose the vials to increased temperatures.
-80°C or vapor-phase liquid nitrogen (-196°C) is preferred for long-term storage, more than one month.

QUALITY REQUIREMENTS:

After preservation, sample vials are opened and evaluated for the following attributes:

- Gram stain and cell morphology
- Colony characteristics, as appropriate
- Purity
 - Sample vials are opened and grown using non-selective media. Culture is examined visually and by staining methods after at least 48 hours incubation.
- Viability
 - Sample vials are opened and checked for growth with a concentration of $>10^4$ cfu/vial.
- Biochemical reactions
 - Sample vials are opened and evaluated with a defined battery of biochemical tests.
- Additional tests including rapid identification schemes and biomolecular analyses may be performed.

All results passed ATCC specifications.

Date: March 16, 2004



Director of Collection Sciences

ATCC hereby represents and warrants that the material provided under this certificate has been subjected to the tests and procedures specified and that the results described, along with any other data provided in this certificate, are true and correct to the best of ATCC's knowledge and belief.

© ATCC, 2003. All rights reserved.

ATCC® is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

American Type Culture Collection
P.O. Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800-638-6597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750
E-mail: tech@atcc.org
Or contact your local distributor.



Certificate of Analysis

ATCC 13932™ – Lot #3515166

BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS:

Catalase	Positive
Oxidase	Negative
Nitrate reduction	Negative
Aesculin	Positive
Urease	Negative
Gelatinase	Negative
Acid production from Purple broth Glucose	Positive
Acid production from Purple broth Ribose	Negative
Acid production from Purple broth Xylose	Negative
Acid production from Purple broth Mannitol	Negative
Acid production from Purple broth Maltose	Positive
Acid production from Purple broth Lactose	Positive
Acid production from Purple broth Sucrose	Negative
Acid production from Purple broth Glycogen	Negative

American Type Culture Collection
P.O. Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800-638-6597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750
E-mail: tech@atcc.org
Or contact your local distributor.



Certificate of Analysis

ATCC® Number: 19119™
 Lot Number: 58471070

Organism: *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii*
 Description: Bacterial cells suspended in cryoprotectant
 Storage: +2°C to +8°C for freeze-dried cultures
 -20°C or lower for frozen cultures

Note: Do not store in freezers with a defrost cycle. This will expose the vials to increased temperatures. -80°C or vapor-phase liquid nitrogen (-196°C) is preferred for long-term storage, more than one month.

Test	Specifications	Results
Gram stain and cell morphology	As appropriate	Gram positive, non-motile, rods, in singles/pairs/chains
Colony description	As appropriate	Small, entire, glistening, circular, smooth translucent, low convex
Purity	Sample vials are opened and inoculated onto non-selective media. Cultures are examined macroscopically and microscopically after at least 24 hours of incubation.	Pass
Viability	Sample vials are opened and checked for growth.	Pass
Phenotypic/genotypic testing	Sample vials are opened and evaluated with a defined battery of biochemical and/or genetic tests which may include the use of automated instrumentation for microbial identification.	Pass

Note: Additional testing is performed as needed for strain authentication and confirmation of specific traits. Antibiotic susceptibility testing is confirmed by CLSI (NCCLS) protocols as needed.

Kim Ellis

21 May 2009

Kim Ellis
 Quality Control Manager; Quality, Compliance and Biosafety

Date

ATCC hereby represents and warrants that the material provided under this certificate has been subjected to the tests and procedure specified and that the results described, along with any other data provided in this certificate, are true and correct to the best of the company's knowledge and belief.

This product is intended to be used for laboratory research use only. It is not intended for use in humans, animals, or for diagnostics.

ATCC products may not be resold, modified for resale, used to provide commercial services, or to manufacture commercial products without prior written agreement from ATCC.

The ATCC trademark and trade name and any and all ATCC catalog numbers are trademarks of the American Type Culture Collection.

© 2009 ATCC. All rights reserved.

ATCC (American Type Culture Collection)
 P.O. Box 1549
 Manassas, VA 20108 USA
 www.atcc.org

800-638-6597 or 703-365-2700
 Fax: 703-365-2750
 E-mail: tech@atcc.org
 or contact your local distributor

ATCC® Certificate of Analysis 33090™

ATCC Catalog Number: 33090™

Organism: *Listeria innocua*

Lot number: 57765700

Product Description: Bacterial cells suspended in cryoprotectant.

Storage: +2°C to +8°C for freeze-dried cultures
-20°C or lower for frozen cultures

Note: Do not store in freezers with a defrost cycle. This will expose the vials to increase temperatures. -80°C or vapor-phase liquid nitrogen (-196°C) is preferred for long-term storage, more than one month.

Quality Requirements:

After preservation, selected sample vials are opened and evaluated for the following attributes:

Test ¹	Methods/Specifications	Test Results
Gram stain and cell morphology	As appropriate	Gram positive, motile rods.
Colony description	As appropriate	Circular, flat, entire, translucent.
Purity	Sample vials are opened and inoculated onto non-selective media. Culture is examined macroscopically and microscopically after at least 24 hours of incubation for contamination.	PASS
Viability	Sample vials are opened and checked for growth.	PASS
Phenotypic/Genotypic testing	Sample vials are opened and evaluated with a defined battery of biochemical and/or genetic tests which may include the use of automated instrumentation for microbial identification.	PASS

¹Additional testing is performed as needed for strain authentication and confirmation of specific traits. Antibiotic susceptibility testing is confirmed by CLSI (NCCLS) protocols as needed.

All results passed ATCC specifications.

Kim Ellis

Kim Ellis
Quality Control Manager; Quality, Compliance and Biosafety

22 January 2008

Date

ATCC® hereby represents and warrants that the material provided under this certificate has been subjected to the tests and procedures specified and that the results described, along with any other data provided in this certificate, are true and correct to the best of the company's knowledge and belief.

This product is for laboratory use only. It is not intended for use in humans, animals or for diagnostics.

ATCC® (American Type Culture Collection)
P.O. Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800-638-6597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750
E-mail: tech@atcc.org
or contact your local distributor.

ATCC® Certificate of Analysis 33090™

ATCC products may not be resold, modified for resale, used to provide commercial services or to manufacture commercial product without prior written agreement from ATCC.

The ATCC trademark and trade name and any and all ATCC catalog numbers are trademarks of the American Type Culture Collection.

© ATCC, 2007. All rights reserved.

ATCC® (American Type Culture Collection)
P.O. Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800-638-6597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750
E-mail: tech@atcc.org
or contact your local distributor.

ATCC[®]**Certificate of Analysis**

ATCC NUMBER: 35967

ORGANISM: *Listeria seeligeri*

LOT: 2652403

EXPIRATION DATE: 2029-03

PRODUCT DESCRIPTION: Bacterial cells suspended in an appropriate cryoprotectant.

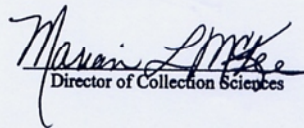
STORAGE: +2°C to +8°C for freeze-dried cultures
-20°C or lower for frozen cultures**Note:** Do not store in freezers with a defrost cycle. This will expose the vials to increased temperatures. -80°C or vapor-phase liquid nitrogen (-196°C) is preferred for long-term storage, more than one month.**QUALITY REQUIREMENTS:**

After preservation, sample vials are opened and evaluated for the following attributes:

- Gram stain and cell morphology
- Colony characteristics, as appropriate
- Purity
 - Sample vials are opened and grown using non-selective media. Culture is examined visually and by staining methods after at least 48 hours incubation.
- Viability
 - Sample vials are opened and checked for growth with a concentration of $>10^4$ cfu/vial.
- Biochemical reactions
 - Sample vials are opened and evaluated with a defined battery of biochemical tests.
- Additional tests including rapid identification schemes and biomolecular analyses may be performed.

All results passed ATCC specifications.

Date: March 16, 2006


Director of Collection Sciences

ATCC hereby represents and warrants that the material provided under this certificate has been subjected to the tests and procedures specified and that the results described, along with any other data provided in this certificate, are true and correct to the best of ATCC's knowledge and belief.

© ATCC, 2004. All rights reserved.

ATCC[®] is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

American Type Culture Collection
P.O. Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org800-638-6597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750
E-mail: tech@atcc.org
Or contact your local distributor.

ATCC® Certificate of Analysis 25923™

ATCC Catalog Number: 25923™

Organism: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

Lot number: 57941605

Expiration Date: 01/31/2013

Product Description: Bacterial cells suspended in cryoprotectant.

Storage: +2°C to +8°C for freeze-dried cultures
 -20°C or lower for frozen cultures
 Note: Do not store in freezers with a defrost cycle. This will expose the vials to increased temperatures. -80°C or vapor-phase liquid nitrogen (-196°C) is preferred for long-term storage, more than one month.

Quality Requirements:

After preservation, selected sample vials are opened and evaluated for the following attributes:

Test ¹	Methods/Specifications	Test Results
Gram stain and cell morphology	As appropriate	Gram positive, non-motile, cocci
Colony description	As appropriate	Small, white, opaque, mucoid, round, domed, β-hemolytic
Purity	Sample vials are opened and inoculated onto non-selective media. Culture is examined macroscopically and microscopically for contamination.	PASS
Viability	Sample vials are opened and checked for growth greater or equal to 10 ⁶ bacteria per mL.	6 x 10 ⁷
Phenotypic/Genotypic testing	Sample vials are opened and evaluated with a defined battery of tests which may include the use of automated instrumentation for microbial identification.	PASS

¹Additional testing is performed as needed for strain authentication and confirmation of specific traits. Antibiotic susceptibility testing is confirmed by CLSI (NCCLS) protocols as needed.

All results passed ATCC specifications.

Kim Ellis

Kim Ellis
 Quality Control Manager; Quality, Compliance and Biosafety

23 April 2008

Date

ATCC® hereby represents and warrants that the material provided under this certificate has been subjected to the tests and procedures specified and that the results described, along with any other data provided in this certificate, are true and correct to the best of the company's knowledge and belief.

ATCC® (American Type Culture Collection)
 P.O. Box 1549
 Manassas, VA 20108 USA
 www.atcc.org

800-638-6597 or 703-365-2700
 Fax: 703-365-2750
 E-mail: tech@atcc.org
 or contact your local distributor.

ATCC® Certificate of Analysis 25923™

This product is for laboratory use only. It is not intended for use in humans, animals or for diagnostics.

ATCC products may not be resold, modified for resale, used to provide commercial services or to manufacture commercial product without prior written agreement from ATCC.

The ATCC trademark and trade name and any and all ATCC catalog numbers are trademarks of the American Type Culture Collection.

© ATCC, 2008. All rights reserved.

ATCC® (American Type Culture Collection)
P.O. Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800-638-6597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750
E-mail: tech@atcc.org
or contact your local distributor.



Certificate of Analysis

ATCC® Number: 6939™
Lot Number: 59131134

Organism: *Rhodococcus equi*
Description: Bacterial cells suspended in cryoprotectant
Storage: +2°C to +8°C for freeze-dried cultures
-80°C or lower for frozen cultures
Note: Do not store in freezers with a defrost cycle. This will expose the vials to increased temperatures.

Test	Specifications	Results
Gram stain and cell morphology	As appropriate	Gram positive, rods, in singles and "V" formations, some are very short like co
Colony description	As appropriate	Two colony types observed: 1) mucoid, opaque, glistening, flat 2) mucoid, opaque, glistening, entire, convex
Purity	Sample vials are opened and inoculated onto non-selective media. Cultures are examined macroscopically and microscopically after at least 24 hours of incubation.	Pass
Viability	Sample vials are opened and checked for growth.	Pass
Phenotypic/genotypic testing	Sample vials are opened and evaluated with a defined battery of biochemical and/or genetic tests which may include the use of automated instrumentation for microbial identification.	Pass

Note: Additional testing is performed as needed for strain authentication and confirmation of specific traits. Antibiotic susceptibility testing is confirmed by CLSI (NCCLS) protocols as needed.

Kim Ellis

Digitally signed by Kim Ellis
DN: cn=Kim Ellis, o=ATCC, ou=QC Manager - Quality, Compliance and Biosafety, email=kellis@atcc.org, c=US
Date: 2010.04.26 15:58:09 -0400

Quality Control Manager; Quality, Compliance and Biosafety

ATCC hereby represents and warrants that the material provided under this certificate has been subjected to the tests and procedure specified and that the results described, along with any other data provided in this certificate, are true and correct to the best of the company's knowledge and belief.

This product is intended to be used for laboratory research use only. It is not intended for use in humans, animals, or for diagnostics.

ATCC products may not be resold, modified for resale, used to provide commercial services, or to manufacture commercial products without prior written agreement from ATCC.

The ATCC trademark and trade name and any and all ATCC catalog numbers are trademarks of the American Type Culture Collection.

© 2010 ATCC. All rights reserved.

ATCC (American Type Culture Collection)
P.O. Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800-638-6597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750
E-mail: tech@atcc.org
or contact your local distributor